

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Oxidativer Stress als Modulator der NMDA- Rezeptorexpression auf zerebrovaskulären Endothelzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Christian Betzen
aus Bingen am Rhein

Mainz, 2010

Tag der Promotion: 5. Juli 2011

Wir wissen
unter allen Dingen in der Welt
von uns am wenigsten.

Karl Spazier
(1761 - 1805)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung.....	11
2. Literaturdiskussion.....	13
2.1. Die Blut-Hirn-Schranke	13
2.2. Exzitoxizität	15
2.2.1. Definition und assoziierte Krankheitsbilder	15
2.2.2. Glutamat als Exzitotoxin	17
2.2.3. Pathogenese der Exzitotoxizität am Beispiel von Glutamat.....	18
2.3. NMDA-Rezeptor.....	19
2.3.1. Klassifikation der Glutamat-Rezeptoren.....	19
2.3.2. Funktion und Struktur des NMDA-Rezeptor.....	21
2.3.3. Wirkmechanismus und assoziierte pathologische Prozesse	22
2.3.4. Expression auf Endothelzellen der Hirnstrombahn.....	23
2.3.5. Endothelzellen unter „Glutamat-Stress“	24
2.4. Oxidativer Stress.....	25
2.4.1. Definition.....	25
2.4.2. Reaktive Sauerstoffspezies	25
2.4.3. Physiologischer Zellstoffwechsel der reaktiven Sauerstoffspezies	26
2.4.4. Pathologische Rolle.....	28
2.5. Fragestellung.....	29
3. Material und Methoden.....	30
3.1. Zellkultur	30
3.1.1. Verwendete Zelllinie	30
3.1.2. Zellmorphologie	30
3.1.3. Kultivierung und Passagierung.....	31

Inhaltsverzeichnis

3.1.4.	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	32
3.2.	Immunhistologie	33
3.2.1.	Prinzip.....	33
3.2.2.	Herstellung der Präparate und Aufnahme.....	34
3.3.	RT-PCR.....	35
3.3.1.	Prinzip der RT-PCR.....	35
3.3.2.	RNA-Aufreinigung.....	37
3.3.2.1.	Prinzip der Aufreinigung.....	37
3.3.2.2.	Durchführung	37
3.3.2.3.	Photometrische Kontrolle	38
3.3.3.	Verwendete Primer	38
3.3.4.	Konvertierung in cDNA und Durchführung der PCR	39
3.3.5.	Herstellung eines Gels zur Darstellung der replizierten cDNA	40
3.3.5.1.	Prinzip	40
3.3.5.2.	Durchführung	40
3.4.	Behandlung der Zellen mit Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	42
3.5.	In-Cell-Western Assay	43
3.5.1.	Prinzip.....	43
3.5.2.	Durchführung.....	44
3.6.	Fluoreszenz-Messungen	46
3.6.1.	Prinzip.....	46
3.6.2.	Durchführung.....	47
3.7.	Impedanzmessungen mit ECIS.....	47
3.7.1.	Prinzip.....	47
3.7.2.	Durchführung.....	48
3.8.	Statistik.....	50
4.	Ergebnisse.....	51
4.1.	NMDA-Rezeptornachweis.....	52
4.1.1.	Immunhistologie	52

Inhaltsverzeichnis

Expression der NR1-Untereinheit auf b.End3.....	52
4.1.2. RT-PCR.....	54
4.1.2.1. Nachweis der NR1-Untereinheit.....	54
4.1.2.2. Nachweis der Untereinheiten NR2 B-D.....	55
4.2. NMDA-Rezeptorexpression nach ROS-Exposition.....	56
4.2.1. In-Cell Western.....	56
4.2.2. Fluoreszenz-Messungen.....	58
4.3. Auswirkungen von ROS auf die Endothelintegrität nach NMDA- Rezeptoraktivierung.....	60
4.3.1. Plateaubildung.....	60
4.3.2. Impedanzänderung.....	61
5. Diskussion.....	62
5.1. NMDA-Rezeptoren auf zerebrovaskulärem Endothel und bEnd3-Zellen.....	62
5.2. Oxidativer Stress erhöht endotheliale NMDA-Rezeptorexpression.....	63
5.3. Vermehrte Rezeptorexpression durch oxidativen Stress verstärkt Glutamatwirkung auf die Blut-Hirn-Schranken-Integrität.....	67
5.4. Formulierung der Hypothese.....	71
5.5. Kritische Würdigung/Einschränkungen.....	72
5.6. Ausblick.....	76
6. Zusammenfassung.....	78
7. Abstract.....	79
8. Literaturverzeichnis.....	80
9. Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10. Lebenslauf.....	97

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
b.End3	immortalisierte murine Zelllinie (brain endothelial)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerol
DiBAC	Bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)-Trimethin-Oxonol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAAT1-5	Excitatory amino acid transporter
ECIS	Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FCS	Fetales Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
ICAM-1	Intercellular-Adhesion-Molecule-1
IgG	Immunglobulin γ
iGlu	ionotrope Glutamatrezeptoren
IP3	Inositoltrisphosphat
mGlu	metabotrope Glutamatrezeptoren

Abkürzungsverzeichnis

MK801	Dizocilpin, (+)-5-Methyl-10,11- Dihydro-5H-Dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-Iminmaleat)
MLC	Myosin-Leichtketten
mRNA	messenger RNA
NAD(P)H	(protoniertes) Nicotinamidadeninucleotid(phosphat)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
O ₂ ⁻	Hyperoxid (früher: Superoxid-Anion)
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
OH·	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
PCP	Phenzyklidin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SNP	Natriumnitroprussid (Sodium Nitroprusside)
SOD	Superoxid-Dismutase
TBE	Tris-borat-ethylendiamintetraessigsäure
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TrisCl	Trishydroxymethylaminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

Einleitung

1. Einleitung

Das zentrale Nervensystem des Menschen ist in seiner Funktion und Struktur sicherlich das komplexeste uns bekannte Organ, jedoch zugleich auch eines der empfindlichsten. Ungeachtet der besonders geschützten Lage in Schädel und Wirbelkanal, einem privilegierten Immunstatus und der besonderen Kompartimentierung durch die Blut-Hirn-Schranke, die vor dem Übertritt von schädlichen Substanzen und Keimen aus der Blutbahn schützt, führen bereits kurzfristige Unterbrechungen der Blutversorgung, Gewalteinwirkungen, Störungen im Energiehaushalt oder Stoffwechsel, Entzündungen und eine Vielzahl weiterer Krankheitsprozesse mit teilweise weitgehend unbekannter Pathogenese häufig zu schweren Schädigungen, die das Individuum in hohem Maße einschränken oder zum Tod führen können. Trotz der sehr unterschiedlichen Ätiologie von Erkrankungen wie Schlaganfall, Hirntrauma, Multiple Sklerose, Alzheimer Demenz, Chorea Huntington und vielen anderen Pathologien, die sich im Gehirn manifestieren können, finden sich Übereinstimmungen zwischen den am Krankheitsgeschehen beteiligten Prozessen.

Viele der neurodegenerativen Krankheitsbilder gehen etwa einher mit einer Steigerung der Produktion sogenannter Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), auch als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Diese chemisch reaktionsfreudigen und kurzlebigen Substanzen erfüllen physiologische Signalfunktionen oder dienen als „immunologische Kampfstoffe“, sind jedoch auch in der Lage, besonders bei Versagen antioxidativer Schutzsysteme, vielfältige Strukturen körpereigener Zellen zu schädigen.

Zur Erklärung eines weiteren häufig beobachteten Phänomens wurde in den vergangenen Jahrzehnten die Hypothese der Exzitotoxizität aufgestellt. Sie beschreibt die nervenzelltoxische Wirkung hoher Konzentrationen von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat. Diese gelangen durch Zelluntergang, Versagen energieabhängiger Transportprozesse oder überschießende Freisetzung aus Neuronen und Gliazellen in hohen Konzentrationen in das Interstitium, wo sie wahrscheinlich vor allem über Vermittlung des ionotropen NMDA-Rezeptors zellschädigende Wirkung entfalten können.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Glutamatrezeptoren, insbesondere auch der ionotrope NMDA-Rezeptor, auch auf nicht-neuronalen Zellen wie dem zerebralen Gefäßendothel vorkommen. Dies ist Teil der Blut-Hirn-Schranke, die das Gefäßlumen gegenüber dem Hirngewebe abdichtet. Ihre Störung und Öffnung wird bei einer großen Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet und kann zu einer schweren Verschlechterung

Einleitung

des Krankheitsbildes beitragen. Die besondere Rolle des NMDA-Rezeptors auf zerebrovaskulärem Endothel wurde zuletzt von verschiedenen Gruppen eruiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Rezeptors durch hohe Dosen von Glutamat zu einem Versagen der Endothelbarriere führt. Weitere Studien legten nahe, dass die durch NMDA-Rezeptoraktivierung generierten ROS dieses Glutamat-induzierte Schrankenversagen vermitteln, eine Wirkung oxidativen Stresses, die man bereits zuvor in Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke beobachtet hatte.

Während bisher beleuchtet worden war, dass es durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors zu einer Generierung von ROS und einem nachgeschalteten Versagen der Blut-Hirn-Schranke kommt, war bislang jedoch ungeklärt, ob ROS ihrerseits auch an der Modulation des NMDA-Rezeptorsystems beteiligt sein könnten.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von oxidativem Stress auf den NMDA-Rezeptor des zerebrovaskulären Endothels zu untersuchen und die sich daraus möglicherweise ergebenden Konsequenzen für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke zu beurteilen.

Hierzu wurde zunächst die Existenz des Rezeptors auf der in den Versuchen verwendeten murinen Zelllinie b.End3 verifiziert. Dies geschah einerseits auf Proteinebene durch Markierung mittels spezifischer Antikörper, die fluoreszierend markiert und anschließend mikroskopisch betrachtet wurden, andererseits durch Replikation und Nachweis der mRNA von am Rezeptoraufbau beteiligten Untereinheiten.

In weiteren Experimenten wurde die Reaktion des Endothels auf eine vorübergehende Exposition gegenüber oxidativem Stress (in der Form der reaktiven Sauerstoffspezies Superoxid, Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid) getestet. Hierzu wurde zunächst durch quantitativen Proteinnachweis mittels fluoreszierender Antikörper in der In-Cell Western Technik die Expression des Rezeptors nach 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Darüber hinaus wurde die Aktivität der NMDA-Rezeptoren unter Stimulation durch den Einsatz eines membranpotentialsensitiven fluoreszierenden Farbstoffes bestimmt. Schließlich erfolgte die Aussaat ROS exponierter Endothelzellen auf speziellen ECIS-Chips, die eine Messung der Impedanz als Maß der Barrierefunktion gestatteten. Nach Ausbildung eines dichten Zellrasens (Monolayer) auf dem Chip wurden die Zellen mit dem spezifischen Rezeptoragonisten NMDA stimuliert und die Barrierefunktion nach weiteren 24 Stunden bestimmt, um eine Aussage über die Auswirkung auf die Blut-Hirn-Schranken-Integrität zu erhalten.

Literaturdiskussion

2. Literaturdiskussion

Die Literaturdiskussion gliedert sich in mehrere Teile. Zunächst sollen kurz Funktion und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke als Schauplatz der beschriebenen Vorgänge *in vivo* erläutert werden. Im folgenden Teil wird das pathologische Phänomen der Exzitotoxizität geschildert und auf den Wirkungsträger Glutamat und seine Rezeptoren genauer eingegangen. Der damit vergesellschafteten Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies ist ein eigener Abschnitt gewidmet. Der letzte Abschnitt stellt die Fragestellung der vorliegenden Arbeit vor.

2.1. Die Blut-Hirn-Schranke

Neurone als zelluläres Substrat der komplexen Hirnfunktionen höherer Lebensformen weisen einen hohen Grad an Differenzierung auf. Damit einher geht jedoch auch eine besondere Anfälligkeit für verschiedenste Noxen und eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber Änderungen des extrazellulären Milieus. Um stabile Bedingungen zu gewährleisten, werden die Nervenzellen einerseits von einem dichten Netzwerk unterstützender Gliazellen versorgt, die u.a. den Nährstofftransport versehen und Änderungen im Ionenmilieu puffern. Zum anderen entwickelte sich im Laufe der Evolution der Wandaufbau der Hirnstrombahn zu einem einzigartig dichten Barriersystem mit reicher Transporterausstattung, die den gezielten, selektiven Transfer von Metaboliten, Ionen und Flüssigkeit ermöglicht und damit eine von Schwankungen der Plasmakonzentrationen unabhängige Einstellung ermöglicht. Dieses im Körper einzigartige System wird als „Blut-Hirn-Schranke“ (BHS) bezeichnet.

Nach dem gängigen Drei-Zellen-Modell beteiligen sich spezialisierte Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten am Aufbau der Schranke.

Die Endothelzellen bilden dabei den eigentlichen Abschluss gegenüber dem Gefäßlumen und sind zugleich Träger der Transportvorgänge. Für die Barrierefunktion wichtig ist die Ausbildung von dichten Interzellulärkontakten. Dabei handelt es sich v.a. um „tight junctions“ und Adhaerenskontakte (3), die ein parazelluläres Übertreten von

Literaturdiskussion

Plasmabestandteilen verhindern und die BHS so beinahe impermeabel für die meisten hydrophilen Substanzen macht. Andererseits jedoch werden Nährstoffe und Zucker sowie verschiedene Vorstufen schnell über die Schranke transportiert. Für viele Stoffe existieren asymmetrische Transportsysteme, so dass etwa intraluminales Kalium die Schranke praktisch nicht passiert, abluminales Kalium aber über spezielle Na^+/K^+ -ATPasen aus dem

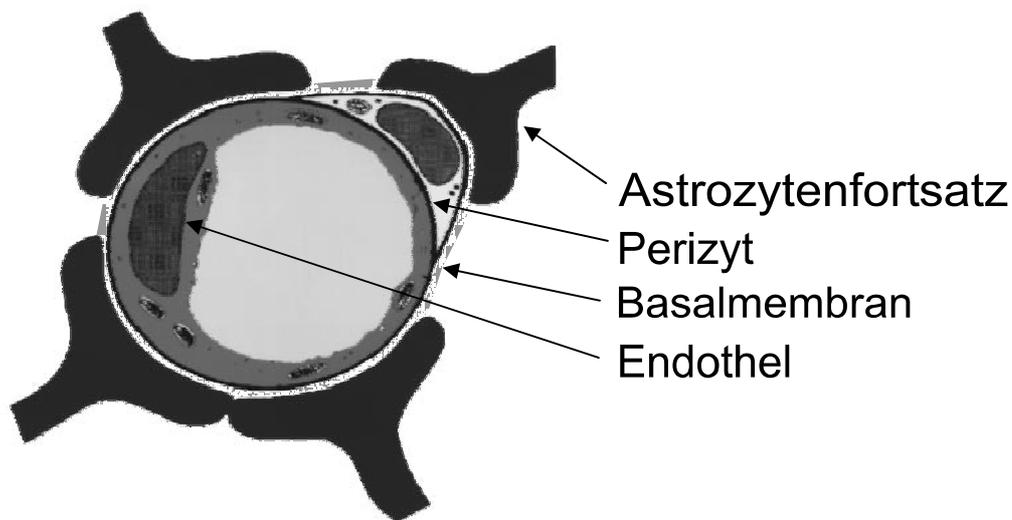


Abbildung 1: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke [modifiziert nach (2)]

Hirnparenchym in die Blutbahn entfernt werden kann (4).

Das Endothel wird zusammen mit den in ihrer Funktion noch unvollständig verstandenen Perizyten von einer dichten, 20 nm breiten Basalmembran umfasst (5). Die Perizyten, die im Kapillarbett *ex vivo* etwa im Verhältnis eins zu drei Endothelzellen vorkommen (2), scheinen neben struktureller Unterstützung und vasodynamischer Steuerung auch eine Rolle in der Angiogenese, ortstypischen Differenzierung und Aufrechterhaltung der Gefäße zu spielen (3;6;7).

Direkt auf die Basalmembran aufgelagert finden sich schließlich die Fortsätze von Astrozyten, die ca. 99% der abluminalen Oberfläche der Kapillargefäße bedecken. Sie scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Induktion diverser BHS-Eigenschaften zu spielen. So weisen Kokulturen von Astrozyten und Endothelzellen in vielen Untersuchungen deutlich höhere Barriereigenschaften auf als Monokulturen von Endothelzellen (8;9).

Auch die umgekehrte Modulierung der Astrozytendifferenzierung durch zerebrovaskuläres Endothel wurde beobachtet (10-12). Die Signalwege, die dieser Interaktion zwischen Astrozyten und Endothel zu Grunde liegen, sind noch Gegenstand intensiver Forschung, da ihre Beeinflussung auch therapeutische Implikationen bergen könnte. In welchem Ausmaß

Literaturdiskussion

jedoch die Ausbildung der BHS nun tatsächlich von dem Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen abhängt, wird kontrovers diskutiert (13;14). Studien, die die embryonale Entwicklung der BHS untersucht haben, legen einen wichtigen Einfluss des neuronalen Mikromilieus nahe; sie konnten unter anderem zeigen, dass eine Differenzierung der BHS bereits vor Beginn der Gliogenese (und damit der Ausbildung von Astrozyten) stattfindet (15;16)..

Einige Hirnstrukturen bilden in vaskulärer Hinsicht eine Ausnahme und verfügen nicht über den Schutz einer dichten BHS. Hierzu zählen die zirkumventrikulären Organe wie etwa die Area postrema, die Neurohypophyse oder die Glandula pinealis. Da viele dieser Bereiche an der hormonvermittelten Regulation der endokrinen Drüsen und des autonomen Nervensystems beteiligt sind, finden sich hier fenestrierte Endothelien, die den Austausch von Botenstoffen und anderen Molekülen über die Gefäßwand ermöglichen (3).

Trotz dieser physiologischen Besonderheiten der zerebrovaskulären Strombahn können jedoch verschiedene Faktoren zum pathologischen Zusammenbruch der BHS mit Erhöhung der Permeabilität und zum Teil folgenschwerem Übertritt von Blutbestandteilen kommen. Im Fokus der Untersuchungen liegen hier vor allem Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Histamin, Serotonin, Arachidonsäure, Nukleotide wie ADP, diverse Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies und Radikale, aber auch exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat (17;18). Auf letztere wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

2.2. Exzitoxizität

2.2.1. Definition und assoziierte Krankheitsbilder

Die exzitatorische Aktivität der Mehrzahl neuraler Synapsen ist gebunden an die Ausschüttung und Wiederaufnahme von Neurotransmittern, die die in der präsynaptischen Terminale einlaufende Information über den synaptischen Spalt hinweg an das nachgeschaltete Neuron vermitteln (19). Dabei bleiben die Mengen der freigesetzten

Literaturdiskussion

Substanzen und deren extrazelluläre Verweildauer sehr gering und ihre Wirkung zumeist auf die am Aufbau des synaptischen Spalts beteiligten Membranen beschränkt, an denen sie Reizweiterleitung sowie Ausschüttung und Wiederaufnahme des Neurotransmitters oder seiner Bestandteile regulieren.

Unter pathologischen Bedingungen jedoch kann es zu einer Akkumulation von Transmittern im Interstitium kommen, die in hohen Konzentrationen toxische Wirkungen entfalten. Olney prägte hierfür den Begriff der „Exzitotoxizität“, der im Folgenden am Beispiel des Glutamat weiter erläutert werden soll (20).

Die Erforschung dieses Phänomens hat im Laufe der letzten Jahrzehnte Hinweise erbracht, die für eine Beteiligung der Exzitotoxizität an einer breiten Front akuter und chronischer neurologischer Erkrankungen sprechen.

Tabelle 1 führt dazu einige Beispiele auf:

Mit Exzitotoxizität assoziierte Krankheitsbilder	Reviews
Akut	
Zerebrale Ischämie, Hypoxie/Reperfusion	(21-24)
Hypoglykämie	(22;25;26)
Trauma	(24;27;28)
Epilepsie	(22;29)
Chronisch	
Morbus Huntington	(30-32)
AIDS Demenz	(33;34)
Morbus Parkinson	(35-39)
Morbus Alzheimer	(40-43)
Amyotrophe Lateralsklerose	(44-48)
Multiple Sklerose und andere demyelinisierende Erkrankungen	(49-51)
Tumorausbreitung (z.B. Glioblastom)	(52)
Glaukom	(53-58)

Tabelle 1: Neurodegenerative Krankheitsbilder, die mit Exzitotoxizität assoziiert sind

Literaturdiskussion

2.2.2. Glutamat als Exzitotoxin

Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei der Neurotransmitter Glutamat. Die Aminosäure findet sich im gesamten Gehirn in höheren Konzentrationen als jede andere Aminosäure und ist dort der häufigste erregende Neurotransmitter, der an möglicherweise bis zu einem Drittel aller schnellen exzitatorischen Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) beteiligt ist (59;60).

Dabei interagiert Glutamat mit einer Vielzahl verschiedener spezifischer Rezeptoren und bestimmt und beeinflusst auf diese Weise viele Hirnfunktionen, wobei neben Kognition, Erinnerung, Wahrnehmung und Bewegungssteuerung auch eine tragende Rolle in der Ontogenese, vor allem bei der Entwicklung des Nervensystems, festzustehen scheint (61-63).

Es ist daher verständlich, dass die Glutamat-Konzentrationen in Hirngewebe und synaptischem Spalt durch vielfältige Regulationsmechanismen kontrolliert werden.

Gegenüber dem Plasma wird das Hirnparenchym, das mit durchschnittlich 0,2-5 $\mu\text{mol/L}$ im Vergleich zu 40-66 $\mu\text{mol/L}$ eine deutlich niedrigere Glutamat-Konzentration aufweist, durch die Blut-Hirn-Schranke und deren Transporter vor einem mengenmäßigen Eintritt von Glutamat geschützt (64;65). Darüber hinaus wird so effektiv verhindert, dass Fluktuationen des Plasmaspiegels durch Nahrungsaufnahme, Metabolismus und Proteinumsatz potentiell schädigende Auswirkungen auf neuronale Prozesse entfalten können, so dass bei intakter Blut-Hirn-Schranke ein direkter systemischer Beitrag zu Glutamatspiegeln im ZNS vernachlässigt werden kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sogar ein Nettoefflux von Glutamat aus dem ZNS ins Plasma stattfindet (59).

In den synaptischen Spalt ausgeschüttetes Glutamat wird kurz nach der Freisetzung über spezifische Transporter (EAAT-1 bis EAAT-5) wieder entfernt und so direkt oder indirekt, über den metabolischen Umweg der Gliazellen (Astrozyten) in Form von Glutamin, wieder in die präterminale Nervenendigung aufgenommen (66). Dort steht es schließlich, nach Umsetzung zu Glutamat und in Vesikeln verpackt, für eine erneute Freisetzung zur Verfügung.

Literaturdiskussion

2.2.3. Pathogenese der Exzitotoxizität am Beispiel von Glutamat

Die komplexen Abläufe des Glutamatzyklus an der Synapse bieten multiple Angriffspunkte für Veränderungen, die für die Entstehung pathologischer extrazellulärer Glutamatkonzentrationen verantwortlich sein könnten. Es ergeben sich dabei folgende Möglichkeiten (67):

[1] Energiemangel: Das hoch-affine astrozytäre Wiederaufnahmesystem für Glutamat ist abhängig von der Aufrechterhaltung eines Natrium-/Kaliumgradienten über der Membran. Wird dieser ATP-abhängige Prozess durch Energiedepletion kompromittiert, wie z.B. unter ischämischer Anoxie bei Infarkt, kann es über einen inadäquaten Abtransport hinaus sogar zu einer Umkehr der Transportrichtung kommen und Glutamat aus den Astrozyten in den Extrazellularraum gefördert werden (68). Die Folge ist eine extrazelluläre Akkumulation von Neurotransmitter.

Ein massiver Energieabfall führt darüber hinaus durch Zusammenbruch des Ionengradienten zur Depolarisation der präsynaptischen Zellmembran, wodurch wiederum eine verstärkte Ausschüttung synaptischer Vesikel getriggert wird.

Auch chronisch-degenerative Pathologien können die Energieversorgung der Zellen nachteilig beeinflussen. Neben toxischer Schädigung der Atmungskette werden vor allem genetische Faktoren, etwa bei Morbus Parkinson und Chorea Huntington diskutiert (69;70).

[2] Neuronale Überaktivierung und synaptische Verstärkung: Unphysiologische Überaktivierung einer neuronalen Verbindung könnte durch persistierenden Glutamatstimulus zu einer Stärkung der Synapse und erhöhter Transmitterfreisetzung führen (71). Auch aus anderen Quellen stammendes Glutamat könnte so den Anstoß für weitere Erhöhung extrazellulären Neurotransmitters geben und einen Teufelskreis initiieren. Für eine vesikuläre Herkunft extrazellulären Glutamats aus einer solchen positiven Feedback-Schleife sprechen die protektive Wirkung von Tetanustoxin (Hemmer der Vesikelausschüttung) und NMDA-Antagonisten in experimenteller Infarkt- und Hypoglykämie modellen (72;73).

[3] Zelluntergang: Gegenüber ihrer Umgebung akkumulieren Neurone und Astrozyten hohe Konzentrationen an Glutamat (5.000-10.000fache der Extrazellulärkonzentration), die bei Zelluntergang in Folge traumatischer Ereignisse, exzitotoxischer Zellzerstörung und anderen akuten und chronischen Schädigungen zur Freisetzung gelangen können (74).

Literaturdiskussion

Es muss vermutet werden, dass die verschiedenen geschilderten Prozesse *in vivo* ineinander greifen und nicht nur isoliert auftreten. So ist z.B. anzunehmen, dass durch Energiemangel freiwerdendes Glutamat wiederum die Freisetzung von Glutamat aus benachbarten Synapsen oder, in höheren, toxischen Konzentrationen, aus absterbenden Zellen befördern würde. Durch derartige Kettenreaktionen ließe sich die Fähigkeit zur Fortpflanzung des zelldegenerativen Effekts auf von der primären Noxe unbetroffene Areale erklären, die in diesem Zusammenhang beobachtet wurde (73).

Bevor nun auf die spezielle Bedeutung solcher exzitotoxischer Konzentrationen von Glutamat auf das zerebrovaskuläre Endothel eingegangen wird, sollen im Folgenden zunächst die beteiligten Rezeptoren als zentrales Element der Glutamat-Wirkung genauer betrachtet werden. Besonderes Gewicht wird dabei auf den NMDA-Rezeptor als putatives Schlüsselement in der Entwicklung und Unterhaltung exzitotoxischer Zustände und endothelialer Reaktion gelegt.

2.3. NMDA-Rezeptor

2.3.1. Klassifikation der Glutamat-Rezeptoren

Die Glutamat-Rezeptoren gehören dem exzitatorischen Teil der großen Familie der membranständigen Aminosäurerezeptoren an, denen die inhibitorischen strichninsensitiven Glycin- (Glyc_A) und die γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA_{A-C}) gegenüberstehen. Die Glutamat-sensitiven Rezeptoren wiederum zerfallen nach ihrem Wirkmechanismus in metabotrope und ionotrope Rezeptoren, die weiter klassifiziert werden können.

Metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGlu) besitzen sieben Transmembrandomänen und vermitteln die Signaltransduktion durch Aktivierung Guanylnukleotid-bindender Proteine („G-Proteine“).

Die acht bisher klonierten metabotropen Glutamat-Rezeptoren lassen sich nach dem Schema ihrer Wirkkaskade wiederum in drei Gruppen einteilen. Dabei kommt es im Verlauf der Aktivierung von Rezeptoren der Gruppe I (mGlu_{1,5}) zu einer Stimulation der Phospholipase C und Bildung der Second Messenger 1,4,5-Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Stimulation von Rezeptoren der Gruppe II (mGlu₂₋₃) und Gruppe III (mGlu_{4,6-8})

Literaturdiskussion

hingegen führt über Hemmung der Adenylatzyklase zur verminderten Bildung von zyklischem Adenosin triphosphat (cAMP) (75).

Auch die ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGlu) können anhand spezifischer künstlicher Antagonisten weiter unterteilt werden. So unterscheidet man die („Non-NMDA“-) AMPA- und Kainat-Rezeptoren, die vor allem schnelle exzitatorische Neurotransmissionen über den Fluss von Natrium- und Kaliumionen vermitteln und mit diversen Kognitionsprozessen (76) in Verbindung gebracht werden, von den NMDA-Rezeptoren. Letztere zeigen eine langsamere Aktivierungskinetik, aber eine 5-10fach höhere Leitfähigkeit als AMPA-/Kainat-Rezeptoren und ermöglichen zudem einen größeren Einstrom von Calcium-Ionen (60;77).

Allen ionotropen Kanälen der Glutamat-Rezeptorfamilie gemein ist eine Tertiärstruktur mit vier Membrandomänen (M_{1-4} , von denen die M_2 -Domäne die Membran nicht durchdringt) und zwei ligandenbindenden extrazellulären Domänen (S_1 und S_2), einem extrazellulär liegenden N-Terminus und einem ins Zellinnere weisenden C-Terminus. Letzterer wird im Zusammenhang mit einer möglichen Assoziation zu metabotropen Signalproteinen diskutiert (78).

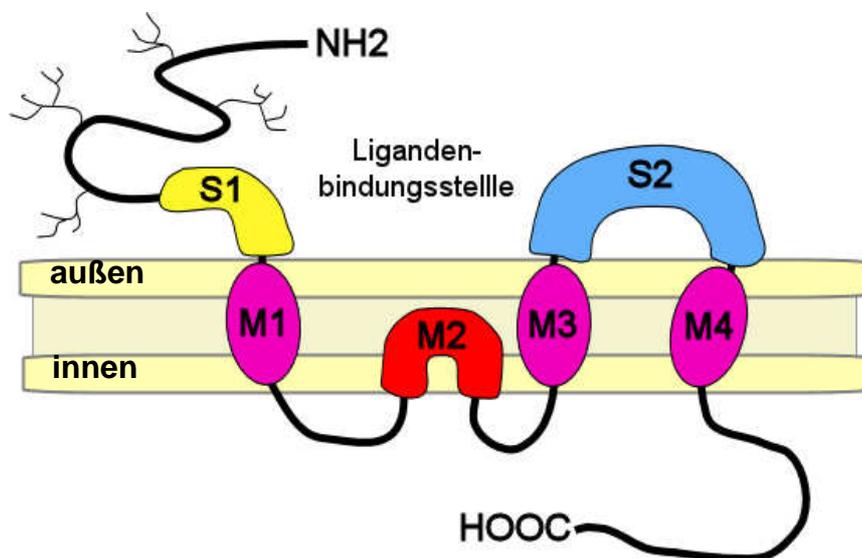


Abbildung 2: Schema der Tertiärstruktur einer Untereinheit des ionotropen Glutamat-Rezeptors mit drei transmembranären ($M_{1,3,4}$) und einer intramembranären Domänen (M_2) sowie zwei extrazellulären Ligandenbindungsdomänen (S_1 und S_2). Die M_2 -Domänen bilden die Kanalpore. [nach (1)]

Literaturdiskussion

2.3.2. Funktion und Struktur des NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor ist für die Forschung in vielerlei Hinsicht von besonderem Interesse: zum einen weist er eine Vielzahl pharmakologisch nutzbarer modulierender Bindungsstellen (wie z.B. für MK801, Spermin, Phencyclidin (PCP), Zn^{2+}) auf, zum anderen wird er mit einer Reihe kognitiver Prozesse wie Lernen und Gedächtnis auf zellulärer Ebene in Verbindung gebracht. Hierfür spielt eine Rolle, dass seine Kanalpore auf neuronalen Zellen bei Ruhemembranpotential durch Magnesium blockiert wird, wodurch ein Ioneneinstrom verhindert wird. Findet jedoch eine ausreichende Stimulation erregender Rezeptoren statt, kann der Block durch Depolarisation der Membran aufgehoben werden. Dieser Mechanismus wird im Zusammenhang mit dem Phänomen der Langzeitpotenzierung und Vorgängen neuronaler Plastizität diskutiert (79;80). Auch in der embryonalen Entwicklung des Cortex und dessen topographischer Anordnung scheint der NMDA-Rezeptor eine Rolle einzunehmen (61).

Verschiedene Untereinheiten konstituieren einen funktionellen Rezeptorkanal, wobei üblicherweise zwei obligate NR1-Untereinheiten durch zwei NR2-Untereinheiten vom Typ A bis D ergänzt werden. Durch die verschiedenen Kombinationen der 8 NR1-Splicevarianten, der 4 NR2-Isotypen, die gleichen oder verschiedenen Typs sein können, und durch die mögliche Ergänzung durch eine NR3-Untereinheit zu einer pentameren Struktur können die physiologischen Eigenschaften des Kanals vielfältig beeinflusst werden (81).

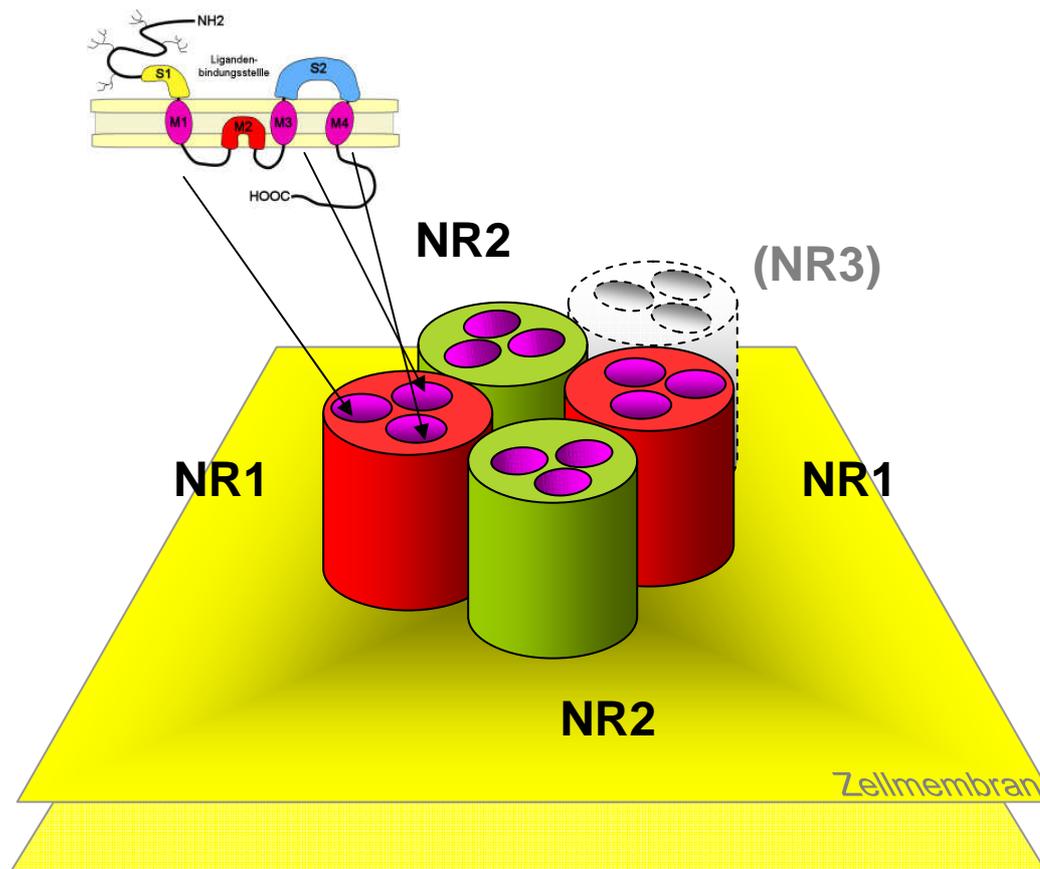


Abbildung 3: Aufbau des tetrameren (pentameren) NMDA-Rezeptors.

2.3.3. Wirkmechanismus und assoziierte pathologische Prozesse

Wie bereits erwähnt entfaltet der aktivierte Rezeptor seine Hauptwirkung als Ionenkanal. Der Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ durch die Kanalpore, dem ein geringerer Ausstrom von K⁺ entgegensteht, führt zu einer Depolarisation der Zelle und kann so zusätzlich spannungsabhängige Calcium-Kanäle einbeziehen, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beitragen. Da Calcium einen geradezu ubiquitären Second Messenger mit einem breiten Spektrum an Wirkungen, z.B. bei Neuronen, darstellt, sollen in diesem Rahmen vor allem die pathologisch relevanten Aspekte erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen genauer betrachtet werden.

Literaturdiskussion

Die verschiedenen pathologischen Mechanismen, die durch hohen Calciumeinstrom angestoßen werden können, sind am besten in Neuronen erforscht, die unter exzitotoxischen Bedingungen einer verlängerten NMDA-Rezeptoraktivierung ausgesetzt sind:

[1] Hohe Calciumkonzentrationen aktivieren die Protease Calpain und führen so zu einer Konvertierung zellulärer Xanthin-Dehydrogenase in eine Oxidase, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt. Daneben führt calciumabhängige Aktivierung einer NO-Synthase zur vermehrten Generierung von Stickstoffmonoxid (NO). In hohen Dosen stört dieses zusammen mit Calcium verschiedene Komplexe der Atmungskette, wodurch es dort zu einer weiteren erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt.

[2] Gleichzeitig wird dadurch die Energieversorgung der Zelle beeinträchtigt. Dies hemmt die Regeneration antioxidativer Schutzsysteme, die normalerweise der Bildung von ROS entgegenwirken. Zusätzlich droht die Entgleisung der intrazellulären Regulation von Calcium. Sie wird durch spezialisierte Pumpen an Plasmamembran und Endoplasmatischem Retikulum versehen, die in hohem Maße ATP-abhängig sind.

[3] ROS bilden eine zentrale Schnittstelle in der pathologischen Kaskade und tragen einen Anteil der NMDA-vermittelten Exzitotoxizität. Über diverse Rückkopplungsmechanismen tragen sie zu einem weiteren Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration bei. Auf ihre vielfältigen weiteren Wirkungen wird im Abschnitt über „Oxidativen Stress“ genauer eingegangen.

2.3.4. Expression auf Endothelzellen der Hirnstrombahn

Neben der Lokalisation auf Neuronen in Cortex, Basalganglien und sensorischen Arealen wurde der NMDA-Rezeptor auch auf einer Reihe nicht-neuronaler und peripherer Gewebe nachgewiesen und charakterisiert (82).

Von besonderer Relevanz für neuropathologische Prozesse ist hier die Lokalisation auf zerebrovaskulären Endothelzellen (83). Obwohl ein dortiges Vorkommen von funktionalen Glutamat-Rezeptoren zuvor kontrovers diskutiert worden war (84;85) und zum jetzigen Zeitpunkt noch keine konkreten Vorstellungen über eine physiologische Funktion bestehen, konnte in den letzten Jahren eine Expression des NMDA-Rezeptors auf verschiedenen primären und sekundären Säugerhirnendothelzellen gezeigt werden (83;86;87).

Literaturdiskussion

Die Ausbildung von NMDA-Rezeptoren auf der in dieser Arbeit verwendeten murinen zerebralen Endothelzelllinie b.End3 konnte auf Proteinebene mittels Western-Blot für die Untereinheiten NR1 und NR2A-B von Scott *et al.* (88) nachgewiesen werden.

Eine mögliche humanmedizinische Relevanz gewinnt diese Entdeckung durch den von Sharp *et al.* erbrachten Nachweis auf primären und sekundären humanen Hirnendothelzellen (86). Aktivierung des Rezeptors mit Glutamat oder dem spezifischen Agonisten NMDA führte hier in supraphysiologischen Dosen (Exzitotoxizitätsmodell) zu einem antagonisierbaren Abfall des Transendothelialen Elektrischen Widerstandes (TEER) und einer damit verbundenen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke.

2.3.5. Endothelzellen unter „Glutamat-Stress“

Unter ischämischen Bedingungen konnte experimentell gezeigt werden, dass interstitielle Glutamat-Spiegel um das 55fache ansteigen und Konzentrationen um 1 mM erreicht werden können (89;90). Eine Akkumulation extrazellulären Glutamats wird dabei auch bei chronischen Pathologien zusätzlich durch den Leistungsabfall der energieabhängigen neuronalen und glialen Transporter und andere oben beschriebene Begleitumstände begünstigt.

Neben den erwähnten Auswirkungen auf Neurone wurden in einer Reihe von Studien Beweise für eine Wirkung von Glutamat auf das Gefäßendothel vorgebracht. Sie wird als Grundlage eines „vasogenen Ödems“ in exzitotoxischen Zuständen angesehen, wo es zu einem schädigenden Übertritt von Blutbestandteilen aus der Blutbahn in das Hirnparenchym kommt (86;91-95).

In einem Teil dieser Studien konnte durch Untersuchungen mit spezifischen Agonisten (NMDA) und Antagonisten (MK-801, Ifenprodil) eine maßgebliche Beteiligung des NMDA-Rezeptors gezeigt werden.

Dabei spielt die Erhöhung des intrazellulären Calciums und die nachgeschaltete Aktivierung intrazellulärer Generatorsysteme für oxidativen Stress eine entscheidende Rolle für die Permeabilitätserhöhung an der Blut-Hirn-Schranke, durch die es zum Einstrom von Wasser und osmotisch wirksamen Soluten in das Hirninterstitium und so zur Ausbildung von Ödemen kommt (96).

Die Auswirkungen oxidativen Stresses werden nun im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

Literaturdiskussion

2.4. Oxidativer Stress

2.4.1. Definition

Nach einer Definition von McQuaid und Keenan beschreibt „Oxidativer Stress“ einen Zustand, in dem es zu einem Ungleichgewicht zwischen oxidierenden und vor Oxidation schützenden Faktoren in einem Gewebe kommt (97).

Wenngleich sogar stark oxidierende Sauerstoffradikale auch physiologischerweise in diverse Signalkaskaden eingeschaltet sind und dort etwa durch Phosphorylierungen oder Regulation von Transkriptionsfaktoren modulierend in den Zellstoffwechsel eingreifen, werden fast ausschließlich bei einem Überwiegen dieser oxidierenden Substanzen Schädigungen beobachtet (98;99), so dass Stoffe wie Glutathion, Vitamin E und ähnliche auch als „antioxidatives Schutzsystem der Zelle“ bezeichnet werden. Besonders bei hohen ROS-Konzentrationen und bei Erschöpfung der protektiven Systeme kommt es zu oxidativen Veränderungen an vielfältigen zellulären Makromolekülen wie Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden sowie zu DNA-Strangbrüchen (18). Diese schädigende Wirkung kann durchaus erwünscht sein, etwa dann, wenn sie von Immunzellen als „oxidierende Kampfstoffe“ generiert und zur Abtötung von Fremdorganismen eingesetzt werden.

2.4.2. Reaktive Sauerstoffspezies

Zentrale Mediatoren des oxidativen Stresses sind die sogenannten „reaktiven Sauerstoffspezies“ (reactive oxygen species, ROS). Dieser Begriff umfasst eine heterogene Gruppe von Sauerstoffderivaten. Zu ihnen zählen freie Radikale, die ein unpaares, reaktionsfreudiges Elektron enthalten, wie das Superoxid-Anion (auch Hyperoxid genannt) (O_2^-) und das sehr reaktive Hydroxyl-Radikal (OH) sowie Stickstoffmonoxid (NO) und Lipidradikale, die nachgeschaltet entstehen können. Daneben existieren stabile Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit ($ONOO^-$) und angeregte Sauerstoffmoleküle wie der Singulett-Sauerstoff (1O_2), die aufgrund ihrer Struktur nicht zur engeren Gruppe der freien Radikale gezählt werden, aber ebenso wie diese zum oxidativen Stress durch ihre stark oxidierenden Eigenschaften beitragen (100).

Literaturdiskussion

Besonders das Gefäßendothel ist physiologisch wie pathologisch oxidativem Stress ausgesetzt. Zusätzlich reagiert es auch selbst auf hormonelle (z.B. Angiotensin II) und physikalische (Dehnung, Scherung) Reize sowie auf Stimulation durch Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor α) mit der Produktion von ROS.

Dies liegt zum einen an der zentralen Rolle des Endothels als erste Frontlinie bei Entzündungsvorgängen: Hier kommt es zur massiven Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Chemokinen und ROS, vor allem durch adhärierende Blutleukozyten, wodurch Permeabilität und Expression von Adhäsionsmolekülen erhöht werden. Zum anderen aber werden auch unabhängig von Abwehrvorgängen ROS etwa zur Regulierung der Gefäßweite benötigt, wofür eigene Enzyme wie etwa die endotheliale NO-Synthase (eNOS) bereitstehen. NAD(P)H-Oxidase sowie die Xanthin-Oxidase stellen zwei weitere wichtige Enzymsysteme dar, die in Endothelzellen der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies dienen (101).

2.4.3. Physiologischer Zellstoffwechsel der reaktiven Sauerstoffspezies

Eine nicht unwesentliche Menge an konstitutiv generierten reaktiven Sauerstoffspezies fällt in den Stoffwechselfvorgängen der oxidativen Phosphorylierung an, wodurch die Mitochondrien als Energielieferanten der Zelle den größten Anteil an der endogenen ROS Produktion tragen (102). Nach älteren Schätzungen werden so 1-2% allen konsumierten Sauerstoffs zu reaktiven Spezies umgesetzt (103). Die von dieser Quelle ständig ausgehende oxidative Exposition der Zelle wird mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht (104).

Dabei ist die in den Mitochondrien primär generierte ROS das Superoxid (O_2^-). Es entsteht dort vor allem durch Vermittlung des radikalischen Elektronenüberträgers Ubisemichinon in der Atmungskette und zerfällt spontan in Verbindung mit H_2O oder durch enzymatische Vermittlung der Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses kann über die eisenkatalysierte Fenton-Reaktion in das hoch reaktive Hydroxylradikal ($OH\cdot$) umgesetzt werden; diesem Reaktionsweg wird jedoch im mitochondrialen Kompartiment durch Entzug dreiwertigen Eisens über Metallchaperone entgegengewirkt (105-108).

Einen anderen Weg für Superoxid bietet die Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO), das vor allem in Endothelzellen generiert wird. Hierbei entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$), das nun ebenfalls in Hydroxylradikal und NO_2 zerfallen kann (107).

Literaturdiskussion

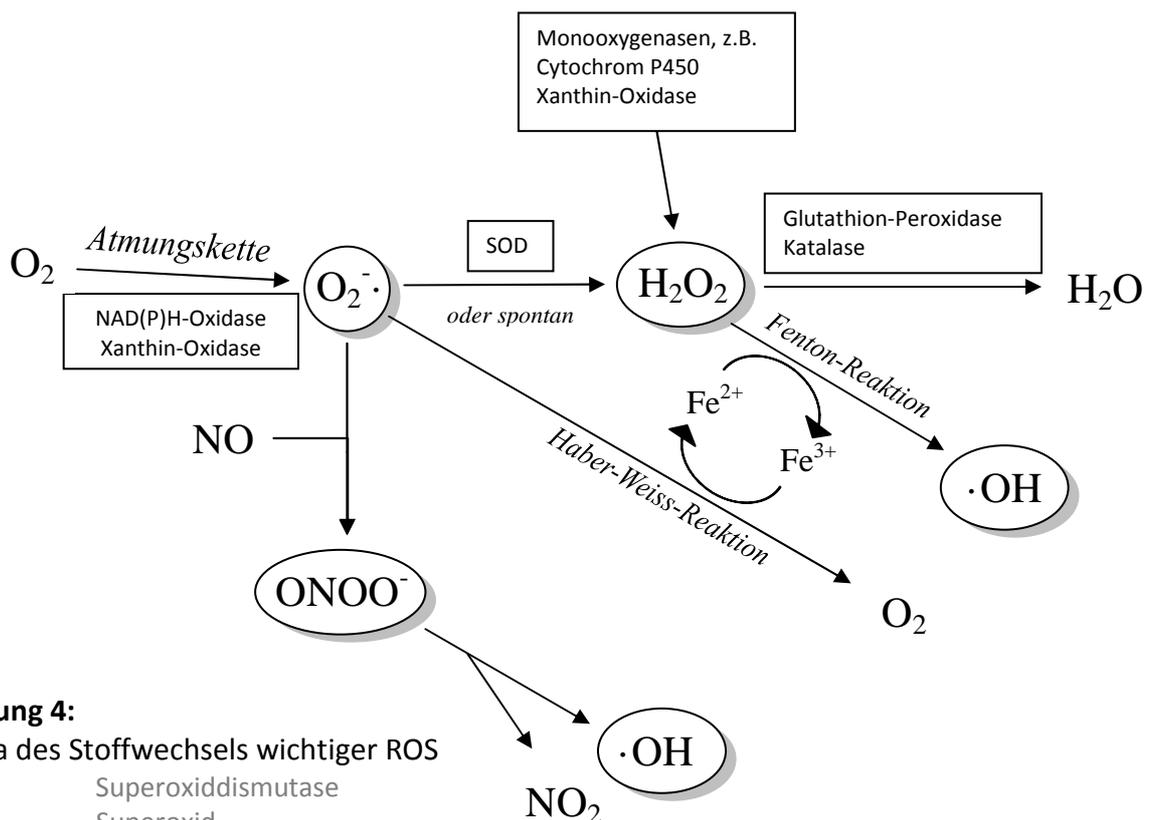


Abbildung 4:

Schema des Stoffwechsels wichtiger ROS

SOD:	Superoxiddismutase
$O_2^{\cdot-}$:	Superoxid
$ONOO^-$:	Peroxynitrit
H_2O_2 :	Wasserstoffperoxid
$\cdot OH$:	Hydroxylradikal

Als Second Messenger spielen ROS u.a. eine Rolle in der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose. Eine Reihe von liganden-aktivierten Enzymen mit NAD(P)H-Oxidase-Aktivität konnte in verschiedenen Geweben und dem Endothel nachgewiesen werden, die über die Produktion von ROS redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B beeinflussen (99). Sie generieren den größten Teil der zytosolisch aktiven ROS (101).

Auch kurzfristige Regulation von Ionenkanälen und des Sekretionsverhaltens endokriner Zellen wird z.B. durch direkte Inaktivierung modulierender Phosphatasen vermittelt.

Spezifität der Signalvermittlung wird zum einen durch die chemischen Eigenschaften der jeweiligen Signal-ROS und des Rezipienten-Proteins, zum anderen durch zeitliche und räumliche Begrenzung der Lebensdauer der ROS gewährleistet. Deutlich überwiegende zelluläre Konzentrationen sogenannter Radikalfänger (Glutathion-System, Superoxid-Dismutase), die eine Umwandlung reaktiver Spezies in weniger toxische Metabolite katalysieren, garantieren einen schnellen Abbau und geringe räumliche Ausbreitung der ROS (109). Zusätzlich existieren nicht-enzymatische Radikalfänger, die reaktive unpaare Elektronen aufnehmen können, ohne selbst Radikaleigenschaften anzunehmen, wie Vitamine

Literaturdiskussion

C, E und andere. So stoppt etwa Vitamin E die Propagierung von Radikalkaskaden und Peroxidationen in Lipidmembranen (110). Diese Schutzsysteme müssen unter Energieaufwand ständig regeneriert bzw. im Fall der Vitamine auch durch Nahrungszufuhr neu aufgefüllt werden; sind die Kapazitäten der Zelle etwa durch Energiemangel erschöpft, können ROS ein pathologisches Übergewicht im Metabolismus der Zelle gewinnen.

2.4.4. Pathologische Rolle

Die schädigende Wirkung von ROS auf das zerebrovaskuläre Endothel ist seit langem bekannt und konnte in einer Vielzahl von Erkrankungen wie akuter Hypertension, zerebraler Ischämie mit anschließender Reperfusion, der Genese von Atherosklerose und Multipler Sklerose gezeigt werden (111-115). Die durch ROS induzierten Veränderungen des Endothels fallen in zwei wesentliche Kategorien: [1] erhöhte Permeabilität mit Übertritt von Plasmabestandteilen und damit verknüpft [2] gesteigerte Leukozytenextravasation. Letztere Wirkung wird maßgeblich durch die vermehrte Expression von luminalen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, P-Selektin) erreicht (116;117), doch auch der Integritätsverlust der Endothelschicht erleichtert die Zellwanderung. Dieser wird durch verschiedene Ereignisse begünstigt: Unter den Bedingungen des oxidativen Stresses kommt es zu einer Herunterregulation und Verlagerung von Zell-Zell-Kontakten (ZO-1, Cadherin), einem Ab- und Umbau des stabilisierenden Aktingerüsts und kortikalen Aktinbandes und zur Ausbildung von Stressfasern (118-121). Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Kette-Kinase und Erhöhung des intrazellulären Calciums führen schließlich zur Aktivierung des kontraktiven Apparats, so dass es durch das Ungleichgewicht von einerseits reduzierten Bindekräften und andererseits erhöhter zentripetaler Spannung zu Formänderungen und Bildung von interzellulären Spalten zwischen benachbarten Endothelzellen kommt (122-127). Dies hat eine Einschränkung der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke zur Folge.

Literaturdiskussion

2.5. Fragestellung

Es ist bekannt, dass pathologisch hohe Konzentrationen von Glutamat am vaskulären Endothel zu einer erhöhten ROS Produktion führen und es in der Folge zu einer Einschränkung der endothelialen Barrierekapazität und einer Exazerbation der zu Grunde liegenden Erkrankung kommen kann.

Während diese Auswirkungen von Glutamat auf die endotheliale Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in verschiedenen Untersuchungen verfolgt wurden, ist unklar, ob umgekehrt auch erhöhte Konzentrationen an ROS, wie sie ebenfalls in verschiedenen dieser Pathologien beobachtet wurden, diese Glutamatwirkung auf Rezeptorebene modulieren.

Ziel der Arbeit war es zu ermitteln, ob oxidativer Stress einen Einfluss auf die Expression von NMDA-Rezeptoren ausübt, die Suszeptibilität von Endothelzellen gegenüber Glutamat beeinflusst und so zu einer Änderung der Permeabilität an der Blut-Hirn-Schranke beiträgt.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Verwendete Zelllinie

Für alle Versuche wurden Zellen der b.End3-Linie verwendet (ATCC, Manassas, USA). Es handelt sich dabei um immortalisierte Mäusehirn-Endothelzellen, die aus primären Zellen durch Transformierung mittels des Polyoma Virus Middle T Antigen gewonnen wurden.

3.1.2. Zellmorphologie

Konfluente b.End3-Zellen bildeten einen dicht gelagerten Monolayer mit spindelförmig verwobenen Zellkörpern.

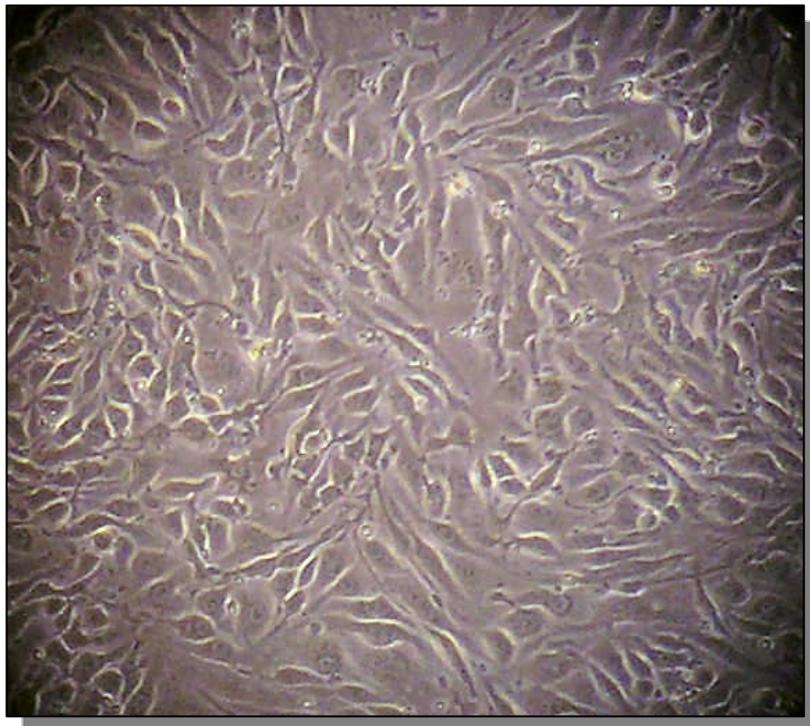


Abbildung 5: Ein fast (~90%) konfluenter bEnd3 Monolayer. In diesem Stadium wurden die Zellen passagiert. (40x)

Material und Methoden

3.1.3. Kultivierung und Passagierung

Die b.End3-Zellen wurden in Kulturflaschen (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) auf 25 cm² bei 37° C und 5% CO₂-Anteil im Brutschrank (Innova CO-48, New Brunswick Scientific, 72622 Nürtingen, Deutschland) kultiviert. Alle Medien und Flüssigkeiten wurden steril angesetzt und behandelt, sowie vor Verwendung im Wasserbad auf 37° C temperiert. Als Kulturmedium wurde DMEM Glutamax (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt mit 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 15% Fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet, das jeden zweiten oder dritten Tag gegen 5 ml neues Medium ausgetauscht wurde.

Die Bearbeitung der Zelllinien fand unter einer Sterilbank (Hera Safe, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland) statt. Alle Kulturen wurden täglich lichtmikroskopisch auf Morphologie, Wachstum und eventuelle Kontaminationen beurteilt, wobei befallene Kulturen verworfen wurden.

Die Passagierung der Zellen erfolgte, wenn die Zellen nach etwa einer Woche gerade einen lichtmikroskopisch geschlossenen Monolayer gebildet, aber noch nicht die typische dichte Lagerung erreicht hatten. Dazu wurde zunächst das Nährmedium und überstehende Zelltrümmer mit einer sterilen Glas-Pasteurpipette (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) abgesaugt, die Zellen mit 5 ml HBSS (1x) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und schließlich mit 1 ml EDTA-Trypsin (liquid, 0,05% Trypsin mit 0,53 Mm EDTA von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 2-5 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Zellen zu lösen. Dabei wurde der Grad der Ablösung mehrfach im Lichtmikroskop kontrolliert, um die Einwirkdauer und potentielle Zellschädigung so gering wie möglich zu halten. Um den Vorgang zu beenden, wurde die Trypsinwirkung mit 9 ml Medium geblockt und die Zellen nach Überführung in ein 50 ml Tube (Sarstedt Ag&Co., Nümbrecht, Deutschland) bei Raumtemperatur und 1000 Umdrehungen/min für 5 Minuten in der Zentrifuge (Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in 10 ml Medium gelöst. Neue Kulturflaschen wurden mit 5 ml Medium und 1 ml Zellsuspension angelegt, Platten (24 oder 96 Well, Greiner Bio One GmbH, Solingen, Deutschland) in den für die jeweiligen Versuche gewünschten Konzentrationen ausgesät, wobei die Zellzahl mit

Material und Methoden

einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (CK40, Olympus, Hamburg, Deutschland) bestimmt wurde.

3.1.4. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur dauerhaften Lagerung eines Zellstamms wurde ein Teil der ersten b.End3-Zellpassagen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um bei Ausfall der kultivierten Zellreihe durch Kontamination oder bei Überschreiten einer gewissen Passagegeneration neue Zellen anzüchten zu können. Nach der 30. Passage wurden die Zellen verworfen und eine neue Zelllinie aufgetaut.

Dazu wurden die aus der Passage gewonnenen Zellen nach Überführung in das 50 ml Tube (s. 3.1.3.) zunächst unter dem Lichtmikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min und Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet auf eine Zellkonzentration von 250.000/ml resuspendiert. Dem hierfür verwendeten Nährmedium wurde zuvor 5% Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt, um eine zellschädigende Kristallisierung des Zellwassers beim Einfrieren zu reduzieren.

Jeweils ein Milliliter dieser Zellsuspension wurde nun in Kryoröhrchen (Symport, Quebec, Canada) überführt und zunächst auf -80°C langsam herabgekühlt, bevor nach einigen Tagen die Endlagerung im Flüssigstickstoffbehälter erfolgte.

Zum Auftauen der Zellen erfolgte zunächst eine zügige Erwärmung im 37°C warmen Wasserbad und anschließende Abzentrifugation zur Entfernung des DMSO-haltigen Einfriermediums, das verworfen wurde. Das Zellpellet wurde anschließend mit Nährmedium resuspendiert und die Zellen wie gewohnt zur weiteren Anzucht in Kulturflaschen ausgesät.

Material und Methoden

3.2. Immunhistologie

3.2.1. Prinzip

Zum Nachweis nativer Proteine auf fixierten Zellen werden spezifische Antikörper eingesetzt, die gegen die gewünschte Zellstruktur gerichtet sind. In einem zweiten Schritt werden diese von Zweitantikörpern erfasst, die eine Spezifität für den invariablen Anteil des Erstantikörpers (F_C-Region) aufweisen. Die Zweitantikörper sind ihrerseits mit einem fluoreszierenden Marker ausgestattet, der eine Detektion gebundener Zweitantikörper unter Fluoreszenzlicht gestattet. Um eine eventuelle unspezifische Bindung des Zweitantikörpers abschätzen zu können, wodurch ein Vorhandensein der gesuchten Zielstruktur vorgetäuscht werden könnte, wird eine Kontrolle durchgeführt, in der nur der markierte Zweitantikörper mit den Zellen in Kontakt kommt.

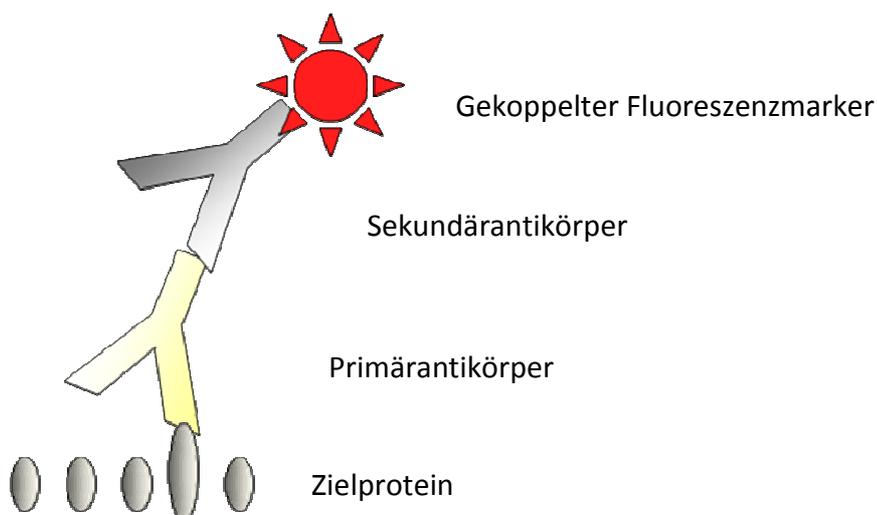


Abbildung 6: Schema der Immunhistologie

In einem zweistufigen Verfahren wird das Zielprotein durch Bindung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

Material und Methoden

3.2.2. Herstellung der Präparate und Aufnahme

Für den Antikörpernachweis wurden bEnd3-Zellen auf Glascoverslips in verschiedenen Zellkonzentrationen (5.000/ml – 10.000/ml – 20.000/ml – 50.000/ml) ausgesät und kultiviert. Nach ein paar Tagen unter mikroskopischer Kontrolle wurden vier Coverslips derjenigen Konzentration ausgewählt, deren Monolayer im Mikroskop der besseren Übersicht wegen noch nicht ganz konfluent erschienen. Nach Verwerfen des Zellmediums wurden die Zellen mit PBS gespült und zur Fixierung für 20 Minuten bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS und jeweils 15 Minuten auf einem Schüttler (Swip, Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland). Nun wurden je zwei der Coverslips mit 300µl Triton X (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland) für 20 Minuten bei 4°C behandelt, um eine Membranpermeabilisierung zu erreichen. Diese Coverslips wurden anschließend für 1 Stunde mit BSA (30mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu reduzieren.

Die jeweils übrigen zwei Coverslips wurden nicht permeabilisiert und direkt mit BSA für 1 Stunde inkubiert.

Zur Beladung mit anti-NR1-Antikörpern wurde für je einen permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Coverslip das BSA verworfen und eine 1:1000 Verdünnung des Erstantikörpers (Kaninchen anti-NR1 IgG, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) mit BSA aufgetragen (300µl). Um eine sensitive Bindung der Antikörper zu erreichen, wurden die Coverslips 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die mit Erstantikörper beladenen Coverslips erneut einer dreimaligen Waschung mit PBS unterzogen (s.o.). Auf den übrigen Coverslips wurde das BSA nun ebenfalls entfernt und anschließend alle Coverslips mit einer 1:500 Verdünnung des Zweitantikörpers (biotinylierter Goat-Anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) mit BSA für 24° bei 4°C inkubiert.

Abschließend wurden die Coverslips nach weiterer dreimaliger Waschung mit PBS auf Objektträgern fixiert und die Antikörperbindung im Konfokalmikroskop (BX41WI, Olympus, Tokyo, Japan mit Krypton Argon Laser, Laser Physics, West Jordan, USA) unter Laserfluoreszenzlicht (488 nm) begutachtet.

Material und Methoden

3.3. RT-PCR

3.3.1. Prinzip der RT-PCR

Die Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) dient der Amplifizierung spezifischer Sequenzen von RNA. Hierzu erfolgt nach Aufreinigung der Zell-RNA zunächst eine Umschreibung in komplementäre DNA, die anschließend in mehreren Zyklen vervielfältigt wird nach dem von Mullins beschriebenen Verfahren der Polymerasen Kettenreaktion durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge, Anlagerung spezifischer kurzer Oligonukleotidprimer und Verlängerung der Primer zu neuen Doppelsträngen mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase.

Die so replizierte cDNA („complementary DNA“) kann schließlich durch Gelelektrophorese dargestellt werden. Durch Vergleich mit dem Laufverhalten einer normierten Skala kann auf die Basenanzahl der replizierten cDNA geschlossen werden.

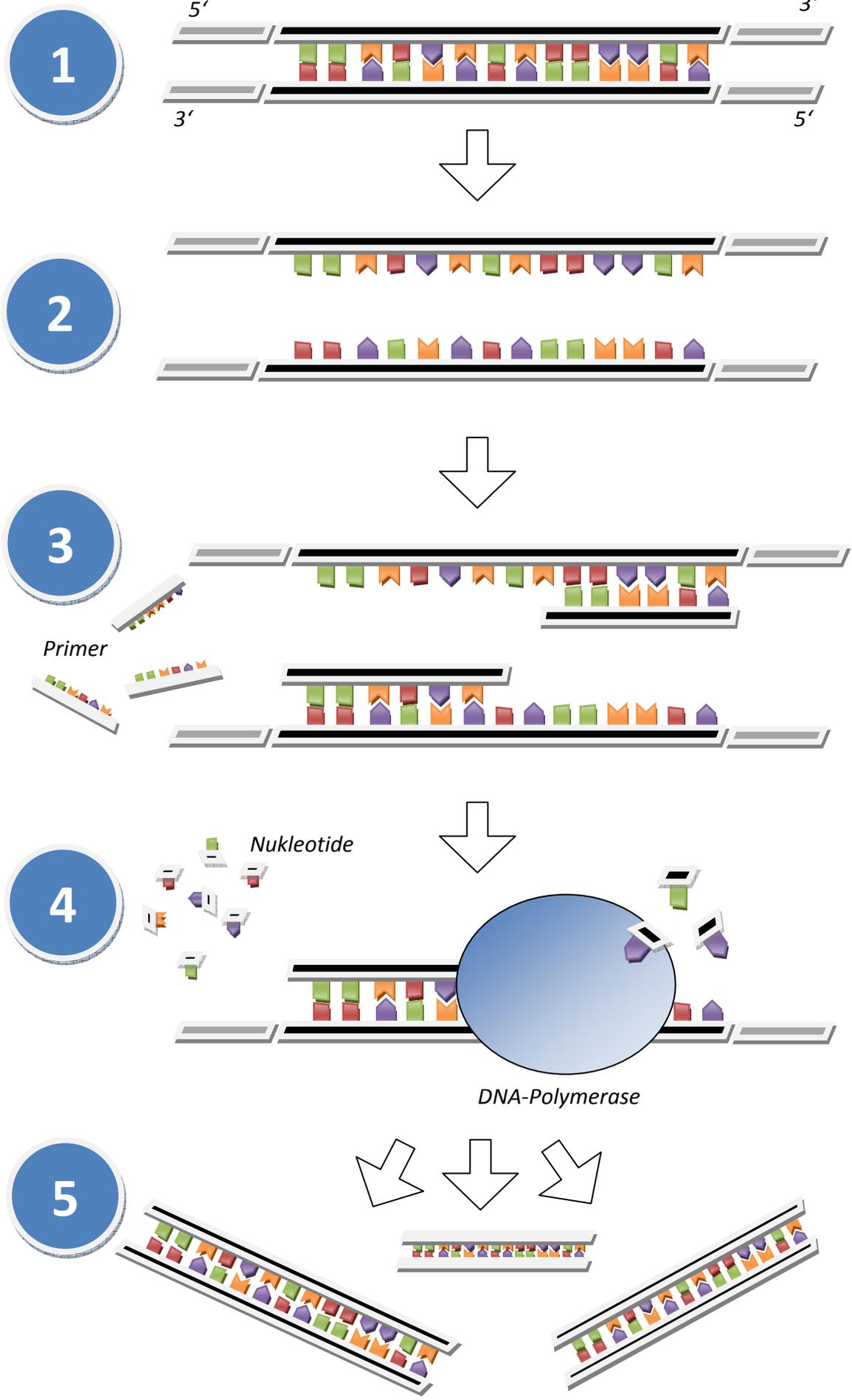
In den durchgeführten Experimenten wurde die Expression der mRNA für die NR1- sowie die NR2B-D-Untereinheiten in b.End3-Zellen untersucht.

Abbildung 7 (nächste Seite): Vereinfachtes Schema der Polymerase-Kettenreaktion

- (1) + (2) Die DNA-Stränge werden durch Hitze aufgetrennt.
- (3) Spezifische kurze Primer werden hinzugegeben, die sich an Anfang bzw. Ende der gewünschten Sequenz anlagern.
- (4) Die DNA-Polymerase lagert sich an den Primer an und ergänzt den komplementären Strang mit zugegebenen Nukleotiden.
- (5) Durch Wiederholung der Schritte 1-4 wird die gesuchte Sequenz spezifisch vervielfältigt.

Für ein detailliertes Protokoll des verwendeten Replikationszyklus, siehe 3.3.4.

Material und Methoden



Material und Methoden

3.3.2. RNA-Aufreinigung

3.3.2.1. Prinzip der Aufreinigung

Um möglichst reine RNA aus Zellmaterial zu gewinnen, wird ein Zelllysat auf einen Säulenfilter aufgebracht, der hochaffin RNA bindet. Andere Zellbestandteile werden in mehreren Waschschritten und durch Zentrifugation entfernt, DNA-Bestandteile zusätzlich spezifisch verdaut. In einem letzten Schritt wird schließlich die Affinität zur Säule durch eine geeignete Lösung (Wasser) reduziert und die gebundene RNA damit eluiert.

3.3.2.2. Durchführung

Die RNA-Gewinnung und Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen GmbH, Deutschland. Hierzu wurden b.End3-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde verworfen und drei Wells im gleichen Volumen 350 µl RLT-Buffer lysiert und gepoolt. Nach Hinzufügen von 350 µl 70% Ethanol wurde das Lysat auf eine RNeasy Spin Column mit Auffang-Tube aufgetragen, die Anordnung für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.

Zur spezifischen Entfernung von DNA-Rückständen aus dem Lysat, die mit dem RNA-Nachweis interferieren könnten, wurde an dieser Stelle vor der weiteren Aufreinigung ein DNA-Verdau durchgeführt:

Zunächst erfolgte ein Waschschriff mit Auftragung von 350 µl RW1-Puffer auf die Elutionssäule („Spin Column“) und Abzentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen/Minute. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die DNase-Lösung (70 µl RDD-Puffer + 10 µl DNase I-Stammlösung, angesetzt aus 1500 Kunitz Units lyophilisierte DNase I gelöst in 550 µl RNase-freies Wasser) aufgetragen und die Säule für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Verdau wurde mit einem erneuten Waschschriff mit RW1-Puffer (s.o.) beendet.

Nun wurde die Säule mit 500 µl RPE-Puffer beladen und kurz für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wurden erneut 500 µl RPE-Puffer aufgetragen und nun für 2 Minuten zentrifugiert, um die Spin Column zu trocknen und Ethanol-Rückstände zu minimieren. Um auch letzte RPE-Puffer-Residuen zu entfernen,

Material und Methoden

wurde abschließend die Säule auf ein neues 2 ml Sammelröhrchen überführt und noch einmal mit maximaler Geschwindigkeit (16.000 Umdrehungen/Minute) für 1 Minute zentrifugiert.

Zur Eluation der gebundenen RNA wurde die Säule nun auf ein 1,5 ml Eppendorf-Sammelröhrchen aufgesetzt, 20 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmembran aufgebracht und die RNA durch Zentrifugation für 1 Minuten bei 10.000 Umdrehungen/Minute ausgewaschen. Eine zweite Sammelprobe wurde durch Wiederholung dieses Schrittes ebenfalls gewonnen.

Die auf diese Weise erhaltene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

3.3.2.3. Photometrische Kontrolle

Der Reinheitsgrad und RNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch überprüft. Hierzu wurde RNA-Lösung der Probe mit 10 mM TrisCl (pH 7,0) [Trishydroxymethylaminomethan + HCl, in geeigneten Pufferbereich titriert] im Verhältnis 1:20 oder 1:50 verdünnt und nach Eichung des Geräts auf den Leerwert der Lösung in RNase-freien Einmal-Küvetten (Plastibrand UV-Küvette mikro, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) mit dem Photometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf AG, Hamburg) gemessen.

3.3.3. Verwendete Primer

Für die Polymerase Kettenreaktion wurden folgende Primer (128) verwendet (von 5' nach 3'):

NMDAR1 (sense)	GCTGTACCTGCTGGACCGCT
NMDAR1 (antisense)	GCAGTGTAGGAAGCCACTATGATC
NR2B (sense)	GCTACAACACCCACGAGAAGAG
NR2B (antisense)	GAGAGGGTCCACGCTTTCC
NR2C (sense)	AACCACACCTTCAGCAGCG
NR2C (antisense)	GACTTCTTGCCCTTGGTGAG
NR2D (sense)	CGATGGCGTCTGGAATGG
NR2D (antisense)	AGATGAAAACCTGTGACGGCG

Material und Methoden

3.3.4. Konvertierung in cDNA und Durchführung der PCR

Zur Vervielfältigung des in der RNA-Aufreinigung erhaltenen genetischen Materials wurde in einem ersten Schritt nun zunächst ein Mastermix angesetzt, der die benötigten Primer, Enzyme, Substrate und Lösungsmittel zur Konvertierung in cDNA und anschließender Replizierung beinhaltet. Hierfür wurde das OneStep RT-PCR Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland eingesetzt. Enzyme wurden dabei bis zur Zugabe im Eisblock aufbewahrt, um Aktivitätsverluste zu minimieren. Die Zusammensetzung des Mastermix geschah unter RNase-/DNase-freien Bedingungen an einer durch UV-Licht gereinigten, für diese Zwecke vorgesehenen Arbeitsbank.

Im zweiten Schritt wurden nun die verwendeten RNA-Proben auf einheitliche Konzentrationen verdünnt (250 ng/μl) und für eine Endkonzentration von 50 ng/μl zusammen mit Mastermix in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Arbeitsvolumen von 50 μl überführt.

Für die nachfolgenden Reaktionen wurden programmierbare Cycler verwendet, die die genaue Steuerung von Temperatur und Dauer der erforderlichen Einzelreaktionsschritte sowie beliebige Zykluszahl

ermöglichen (MasterCycler gradient/personal, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Folgendes Protokoll wurde dabei verwandt:

1. Reverse Transkriptase Reaktion (Konvertierung der RNA in cDNA) für 30 min bei 50°C
2. Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase und -aktivierung der DNA-Polymerase für 15 min bei 95°C
3. Replizierungszyklus:
 - 3.1. Denaturierung (=Auftrennung) der DNA-Doppelstränge („Schmelzen“) (30 sec bei 94°C)
 - 3.2. Anlagerung der Primer an spezifische Enden der zu replizierenden cDNA-Sequenz (30 sec bei 52°C)
 - 3.3. Verlängerung der Primer durch DNA-Replikase (1 min bei 72°C). Hierbei handelt es sich um den eigentlichen Replikationsvorgang.

Material und Methoden

3.4. Wiederholung des Zyklus ab 3.1. je nach gewünschter Sensitivität. Für den NR1 Nachweis wurden initial 45 Zyklen verwandt, der Nachweis der NR2 Untereinheiten erfolgte nur noch mit 30 Zyklen, um hohe Spezifität zu gewährleisten.

4. Finaler Verlängerungsschritt (10 min bei 72°C)

5. Kühlung des Reaktionsprodukts bei 4°C bis zur Weiterverwendung.

3.3.5. Herstellung eines Gels zur Darstellung der replizierten cDNA

3.3.5.1. Prinzip

Das Verfahren der Gelelektrophorese kommt zur Auftrennung verschieden großer Molekülfraktionen zum Einsatz. Die Gelmatrix, in die das Molekülgemisch eingebracht wird, weist eine gitter- oder netzartige Struktur auf. Wird ein Strom angelegt, beginnen die geladenen Teilchen des Gemisches zu wandern; im Fall von Nukleinsäuren wie der DNA, die aufgrund ihres Phosphatgerüsts viele negative Ladungen tragen, findet eine Wanderbewegung in Richtung der positiv geladenen Kathode statt. Bedingt durch die unterschiedliche Größe bzw. Länge der Moleküle werden nun kleinere Moleküle schneller die Gelmatrix passieren als größere, die durch die Netzstruktur des Gels stärker zurückgehalten werden. Es resultiert nach einer gewissen Zeit eine Auftrennung in vorseilende, schnell wandernde Fraktionen und langsamere, die im Fall von cDNA sehr gut mit den Größenverhältnissen (Anzahl der Basenpaare) korrespondiert. Ein auf einer parallelen Spur laufendes Gemisch fest definierter Größen (z.B. 100 bp, 200 bp...) ermöglicht durch Vergleich mit den Banden der Probe eine Abschätzung der enthaltenen cDNA-Größen.

3.3.5.2. Durchführung

Das verwendete Gel wurde auf der Basis von Agar-Agar, einem Algenextrakt, hergestellt. Hierzu wurde eine 1% Lösung mit (0,5x) TBE angesetzt, die bei Raumtemperatur zu einem

Material und Methoden

festen, flexiblen Gel erstarrt. Die Lösung wurde bei Bedarf in einer Mikrowelle durch Erhitzen verflüssigt. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet, dass die siedende Flüssigkeit keine unverflüssigten Reste enthielt, die als Schlieren sichtbar wären und die Homogenität der Gelstruktur beeinflussen könnten. Die Flüssigkeit wurde zum Aushärten in eine passende Form gegossen, erneut auf eventuell entstandene Luftblasen kontrolliert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur bis zum Erstarren abgekühlt. Ein zuvor eingesetzter Kamm bildet dabei im Gel die Taschen, in die später das PCR-Produkt eingefüllt werden kann.

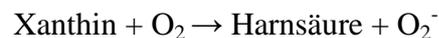
Ein spezieller Farbstoff (Blue Orange Loading Dye 6x, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), der der visuellen Kontrolle des Fortschritts der Elektrophorese dient, wurde nun jeweils 1:6 den Reaktionsprodukten der PCR hinzugegeben. Das erkaltete Gel wurde von der Form in eine mit (0,5x) TBE gefüllte Elektrophoresekammer überführt, die Geltaschen mit den PCR-Produkten befüllt und eine weitere Tasche mit einem DNA-Skalengemisch befüllt (100bp DNA/RNA Ladder Skala). Die Elektrophorese wurde nun durch Ansetzen von Gleichstrom mit einer Spannung von 100 V für 30 Minuten durchgeführt.

Zur Visualisierung der aufgetrennten cDNA kam ein UV-fluoreszierender Farbstoff (Sybr® Green, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland) zum Einsatz. Dazu wurde dieser mit (0,5x) TBE im Verhältnis 1:10.000 gemischt und das Gel in dieser Lösung nach Abschluss der Elektrophorese für 45 Minuten bei leichter Schwenkbewegung und Zimmertemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel vorsichtig mit VE-Wasser abgespült und blasenfrei auf die Oberfläche einer UV-Durchlichtplatte (GelVue GVM20, Synoptics Ltd., Cambridge, Großbritannien) aufgebracht. Unter dem UV-Licht konnten nun die fluoreszierenden Banden der Elektrophorese beurteilt und fotografiert werden.

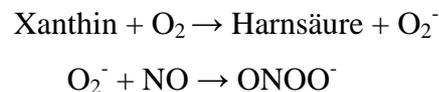
Material und Methoden

3.4. Behandlung der Zellen mit Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Um die Auswirkungen oxidativen Stresses auf Endothelzellen zu untersuchen, wurden diese für einen kurzen Zeitraum gegenüber den reaktiven Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxid (O_2^-) oder Peroxynitrit (ONOO^-) exponiert. Da es sich bei den letzteren um flüchtige Verbindungen mit geringer Stabilität handelt, wurden sie durch eine enzymatische Reaktion direkt im Versuchsmedium generiert. Dazu wurde die Reaktion von Xanthin-Oxidase mit seinem Substrat Xanthin eingesetzt, in der molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor auftritt und zur reaktiven Sauerstoffspezies Superoxid umgeformt wird:



Durch Zugabe des Stickstoffmonoxid-Donators Nitroprussid (SNP) kann diese Reaktion zum Endprodukt Peroxynitrit fortgeführt werden:



Eingesetzt wurden für alle Versuche folgende Konzentrationen: 1 mM H_2O_2 (verdünnt aus 30% Stammlösung) für die Versuche mit Wasserstoffperoxid, 100 μM Xanthin und 10 mU/L Xanthin-Oxidase (Grade IV) für Superoxid sowie zusätzlich 1 μM SNP (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland) für die Experimente mit Peroxynitrit.

Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Fortführung des Versuchs im Brutschrank belassen. Eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen direkt nach Stimulation und zu späteren Zeitpunkten zeigte keine deutlich erkennbaren Änderungen der Zellmorphologie.

Material und Methoden

3.5. In-Cell-Western Assay

3.5.1. Prinzip

Das Verfahren des In-Cell-Western dient der antikörpergestützten Detektion von Zellproteinen im fixierten Zellverband. Hierzu wird zunächst ein Primärantikörper gegen die eigentliche Zielstruktur gerichtet. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem Zweitantikörper, der an den Primärantikörper bindet. Der Zweitantikörper kann nun fluoreszierend oder radioaktiv markiert werden und so die Proteinbindung anzeigen. Um die Menge des detektierten Proteins in ein Verhältnis zur Zellzahl zu setzen, werden zusätzlich z.B. DNA-färbende Fluoreszenzmarker eingesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Versuche sollte die Expression der NR1-Untereinheit als wesentlichem Bestandteil des NMDA-Rezeptors unter Exposition mit verschiedenen freien Sauerstoffradikalen (Superoxid O_2^- , Peroxynitrit $ONOO^-$, Wasserstoffperoxid H_2O_2) untersucht werden.

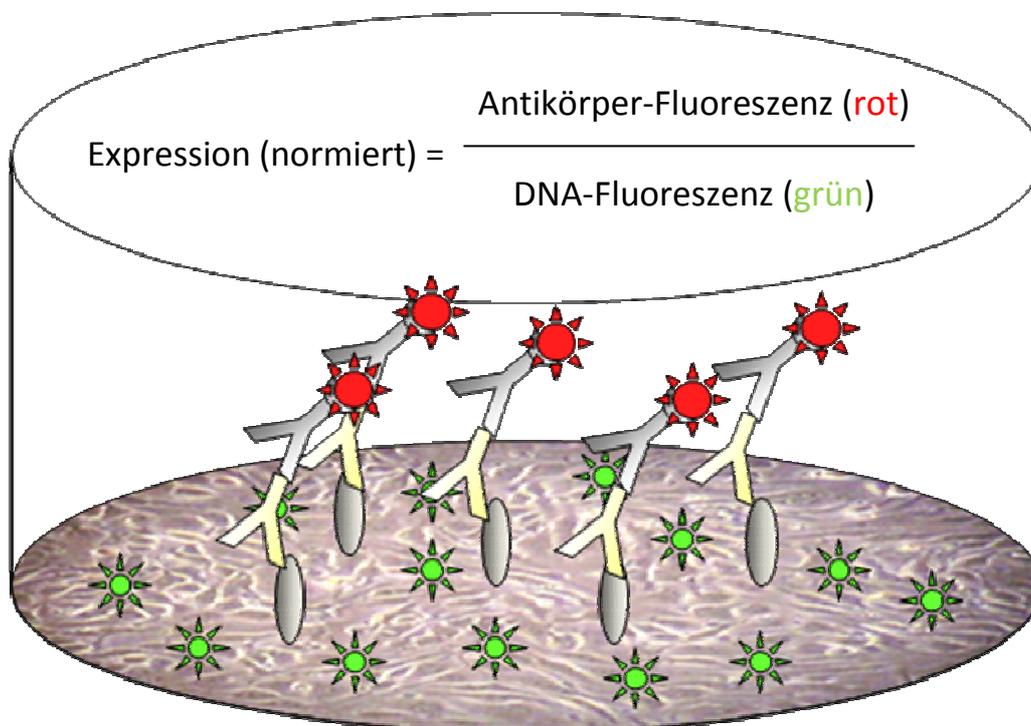


Abbildung 8: Schema des InCell Western

Die gesuchte Struktur wird durch spezifische Primärantikörper detektiert, an die fluoreszierend markierte Zweitantikörper binden.

Grün angedeutet die DNA-Färbung mittels Syto, um die Antikörperbindung in Bezug zur Zellzahl setzen zu können.

Material und Methoden

3.5.2. Durchführung

bEnd3-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und kultiviert. 24 Stunden vor Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen für 30 Minuten mit Sauerstoffradikalen stimuliert (siehe 3.4.) und nach einem Mediumwechsel für weitere 24h im Brutschrank inkubiert.

Nach Aspiration des Kulturmediums wurden die Zellen mit 150 µl 4% Paraformaldehydlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur für 20 Minuten fixiert.

Die Fixierlösung wurde entfernt und die Zellen mit Triton Waschlösung, bestehend aus (1x) PBS mit 0,1% Triton X 100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland), permeabilisiert, indem pro Waschvorgang die Zellen mit je 200 µl Lösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert wurden.

Es folgte ein Blockierungsschritt mit je 150 µl eines Puffers aus (1x) PBS mit 10% FCS für 1,5 Stunden auf dem Schüttler, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren.

Nach Absaugen wurden erneut eine Reihe Wells mit 50 µl des Blockpuffers versetzt, um später als Kontrolle für unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers zu dienen, während alle anderen Wells mit 50 µl einer 1:500 Verdünnung des anti-NR1-Antikörpers (Kaninchen anti-NR1 IgG, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) mit dem Puffer beladen wurden, um danach für 2 Stunden auf dem Schüttler bei leichter Bewegung und Raumtemperatur zu inkubieren.

Anschließend folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit 200µl TWEEN-Waschlösung, bestehend aus 1x PBS mit 0,1% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler.

Der Zweitantikörper (biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) wurde mit Blockpuffer 1:800 verdünnt in je 50 µl auf alle Wells aufgetragen und für eine Stunde auf dem Schüttler belassen. Daran anschließend erfolgte eine erneute dreimalige Waschung mit TWEEN-Lösung (s.o.).

Um den Zweitantikörper fluoreszent zu markieren, wurde nun durch einstündige Inkubation ein roter Farbstoff (1:1000 Cy3 Streptavidin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) an diesen angekoppelt und ungebundene Überstände mit dreimaliger TWEEN-Waschung entfernt. Um die Antikörperbindung in Bezug auf die Zellzahl quantifizieren zu

Material und Methoden

können, wurden die Zellen in diesem Schritt zusätzlich mit einem grünen DNA-Farbstoff (Sytho 16, 1:1000 in Blockpuffer, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert.

Nach vollständiger Entfernung der Waschlösung wurde im Platerader (Tecan Infinite F200, Tecan Trading AG, Schweiz) die Fluoreszenz von markiertem Sekundärantikörper bzw. DNA-Marker bei Exzitationswellenlängen von 540 nm bzw. 485 nm und Emissionswellenlänge von 585 nm bzw. 535 nm gleich gemessen.

Material und Methoden

3.6. Fluoreszenz-Messungen

3.6.1. Prinzip

Um das Ausmaß der Rezeptoraktivierung nach Stimulation mit geeigneten Liganden zeitnah zu erfassen, bietet sich, neben der elektrophysiologischen Methode der direkten Ableitung an Einzelzellen, für größere Zellverbände die Möglichkeit der indirekten Messung über fluoreszierende Indikatoren. Bei dieser Gruppe von stofflich sehr heterogenen Substanzen handelt es sich um Moleküle, die bei einer zu untersuchenden Zustandsänderung der Zelle ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern und durch Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge zur Emission von Photonen anderer Wellenlänge angeregt werden können. Auf diese Weise kann etwa, wie im folgend geschilderten Experiment, die Änderung der Membranpolarisation eines Zellverbands nach Rezeptorstimulation untersucht werden. Der verwendete Farbstoff DiBAC (Bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)-Trimethin-Oxonol) reagiert auf Hyperpolarisation der Membran mit Verminderung, auf Depolarisation mit Erhöhung der Fluoreszenz, wobei typischerweise Änderungen von 1% einer Membranpotentialverschiebung von 1 mV entsprechen.

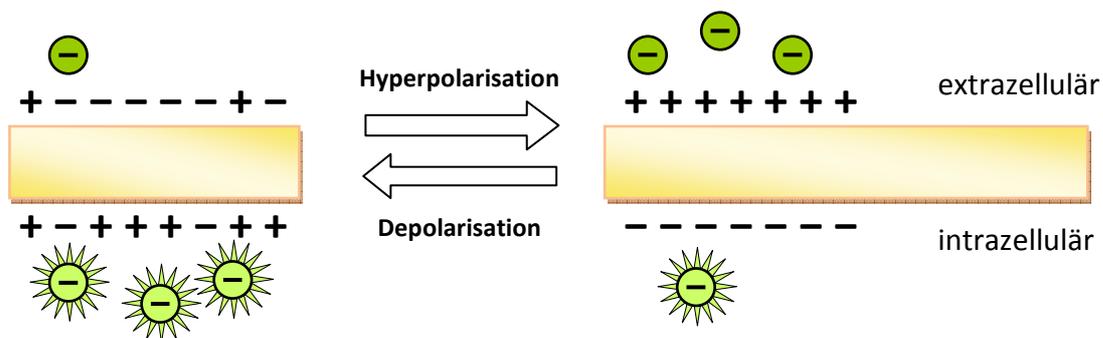


Abbildung 9: Funktionsprinzip des Membranfarbstoffs DiBAC.

Abhängig vom Kontakt zum intra- oder extrazellulären Milieu ändert der Indikator sein Fluoreszenzverhalten. Über ionophoretische Vorgänge transloziert das Anion bei Hyperpolarisation auf die extrazelluläre Membranseite, während es sich in depolarisierten Zuständen vermehrt intrazellulär anlagert und dort zu stärkerer Fluoreszenz anregbar ist.

[mod. nach einer Abbildung der Invitrogen GmbH

(<http://probes.invitrogen.com/lit/catalog/3/sections/7735.html>)]

Material und Methoden

3.6.2. Durchführung

bEnd-Zellen wurden auf 96-Well Platten ausgesät und kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen bei einsetzender Bildung eines Monolayers für 30 Minuten gegenüber Sauerstoffradikalen exponiert und nach Mediumwechsel für weitere 72h im Brutschrank inkubiert. Für die darauf folgende Messung wurde das Medium verworfen und eine einstündige Inkubation im Brutschrank mit dem membranpotentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC (1:1000 in HBSS mit 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂ and 10 mmol/l Glukose) angeschlossen. Die Platten wurden daraufhin in den ebenfalls auf 37 °C temperierten Platerader überführt. Da der Farbstoff einen deutlichen initialen Fluoreszenzabfall aufweist, wurde zunächst eine halbstündige Vormessphase implementiert, um eine anschließende Hauptmessung unter stabilen Bedingungen zu ermöglichen. Diese erfolgte nach Zugabe von NMDA bzw. Kontrollen und geräteseitigem einsekündigem Schwenken der Platten, um eine gleichmäßige Stoffverteilung zu gewährleisten.

3.7. Impedanzmessungen mit ECIS

3.7.1. Prinzip

„Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing“ (ECIS) ist ein Verfahren, dass der Messung der elektrischen Impedanz (vereinfacht vergleichbar mit dem elektrischen Widerstand) über einen lebenden Zellmonolayer dient. Es wird unter anderem zur Untersuchung von Wachstumsverhalten und Differenzierung von Zellverbänden mit Barrierefunktion wie den zerebrovaskulären Endothelzellen eingesetzt.

Im Zellmedium („Substrat“) gelöste Ionen vermitteln dabei einen Stromfluss über die Zellschicht zwischen den an eine Messstation angeschlossenen Elektroden. Die dabei aus den Messungen errechnete Impedanz, die dem Fluss von Ionen entgegenwirkt, kann näherungsweise als Maß für die Dichtigkeit respektive Durchlässigkeit des Monolayers angesehen werden. Sie wird vor allem durch die Ausbildung eines dichten Zellrasens und die

Material und Methoden

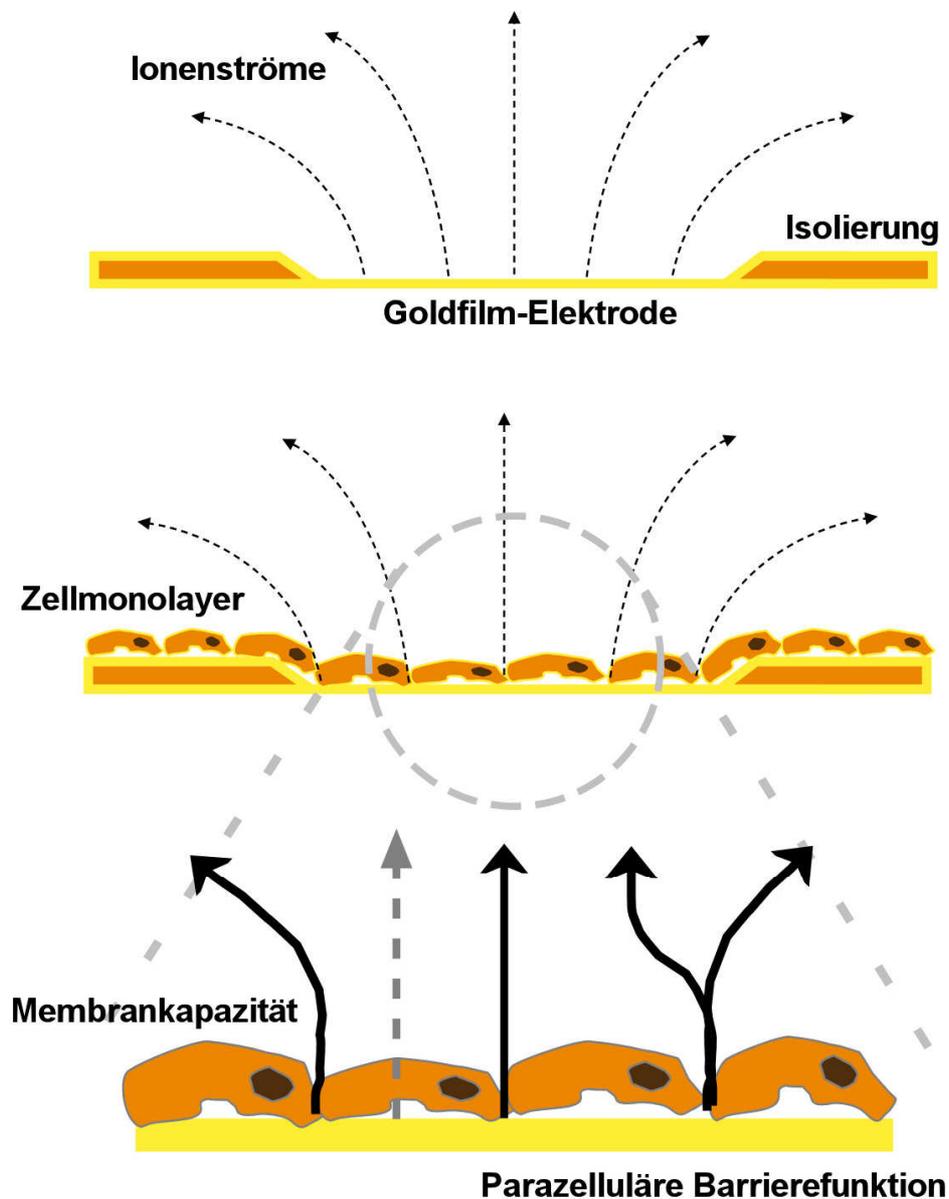
Expression von Interzellulärkontakten bestimmt; darüber hinaus fließt auch die Membrankapazität der Zellen in die Ermittlung mit ein. Bei einer Kompromittierung der Schrankendichte ist durch den erhöhten Stromfluss mit einem Abfall der Impedanz zu rechnen.

Ein Vorteil des ECIS-Systems ist die Möglichkeit, Veränderungen der Impedanz in „Echtzeit“ bereits während der initialen Wachstumsphase und im gesamten weiteren Verlauf des Experiments beobachten zu können.

Für die Impedanzmessungen der folgenden Experimente wurde ein Setup der Firma ibidi in Kooperation mit Applied BioPhysics, Martinsried, Deutschland, eingesetzt. Die Zellaussaat erfolgte auf goldbeschichtete 8-Well-Elektrodenarrays, die während der Messungen im Brutschrank verblieben.

3.7.2. Durchführung

Anschließend an eine etwaige Vorstimulation mit ROS in konfluenten Kulturflaschen und darauf folgenden Medienwechsel wurden die Zellen nach weiteren 24 Stunden trypsinisiert und wie gewohnt für die Aussaat vorbereitet (s. „Zellkultur“). Es wurden je 50.000 Zellen pro Well eingesetzt, gelöst in einem Arbeitsvolumen von je 300 µl Medium. Nach der Aufbringung auf die elektrodenbeschichteten Wells des ECIS-Setups wurden diese an die Messstation angeschlossen, in den Brutschrank überführt und die Impedanzmessung mit einer Wechselstromfrequenz von 15 kHz gestartet, die in Abständen von wenigen Sekunden erfolgte. Zugabe von NMDA als spezifischem Rezeptoragonist erfolgte 48 Stunden nach Aussaat und Beginn der Impedanzmessung. Die Zellen hatten bereits nach etwa 36 Stunden ein im Zeitverlauf deutlich erkennbares Wachstumsplateau erreicht, in dem die Zellen einen konfluenten Monolayers ausbilden und es zu keinem weiteren Ansteigen der Impedanz kommt.



(Zeichnung nicht maßstabsgetreu)

Abbildung 10: Das Schema des ECIS-Chips zeigt den Stromfluss und die wesentlichen determinierenden Komponenten der Impedanzmessung. Wird der Ionenfluss von der basalen Elektrode zur Referenzelektrode durch eine dichte interzelluläre Barrierefunktion inhibiert, steigt die Impedanz des Systems und kann an der Messapparatur registriert werden. Im umgekehrten Fall wird eine Steigerung der Barrierepermeabilität zu erhöhtem Ionenfluss und messbarem Abfall der Impedanz führen [mod. nach einer Illustration von BTX® Harvard Apparatus (<http://www.btxonline.com/products/ecis/>)]

Ergebnisse

3.8. Statistik

Für die Auswertung wurden die experimentellen Daten in das Programm Excel 2003 (Microsoft, Seattle, USA) migriert, statistische Tests wurden mit GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Signifikanzberechnungen erfolgten mittels One-Way-Anova-Test mit anschließendem post-hoc Tukey-Test.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente vorgestellt, deren Durchführung in Kapitel 3 beschrieben wurde. Zunächst wird in Abschnitt 4.1. die Existenz des NMDA-Rezeptors auf der b.End3-Zelllinie mittels Immunhistologie und RT-PCR verifiziert. Der anschließende Abschnitt 4.2. ist der Auswirkung reaktiver Sauerstoffspezies (H_2O_2 , O_2^- , ONOO^-) auf die Expression des Rezeptors gewidmet. Mittels In-Cell-Western wurde die Proteinexpression untersucht. Daten der Fluoreszenz-Messungen mit dem membranpotentialsensitiven Farbstoff DiBac legen nahe, dass an eine veränderte Proteinexpression auch funktionelle Änderungen der Zellantwort auf Rezeptorstimulation geknüpft sind.

Im Abschnitt 4.3. werden die Erkenntnisse der bisherigen Untersuchungen auf ihre möglichen Konsequenzen für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke überprüft. Die Daten der Impedanzmessungen an Monolayern der Endothelzellen geben Auskunft über den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf Permeabilitätsänderungen, die durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors vermittelt werden.

Ergebnisse

4.1. NMDA-Rezeptornachweis

Mittels Western-Blot wurde auf der b.End3-Zelllinie bereits in Lysaten durch spezifische Antikörper das Vorhandensein von NR1 und NR2A/B Untereinheiten von Scott et al. demonstriert (88). Auch funktionelle Daten aus dieser Studie legen die Präsenz des Rezeptors nahe. Die Nachweisversuche, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden, dienen daher vorrangig der weiteren Absicherung durch komplementäre Techniken (einerseits ein immunhistologischer Nachweis *in vitro*, andererseits ein Nachweis von mRNA mittels RT-PCR) sowie der Frage nach weiteren möglicherweise vorhandenen NR2-Untereinheiten.

4.1.1. Immunhistologie

Im Rahmen der Immunhistologie sollte die für den NMDA-Rezeptor funktionell essentielle NR1-Untereinheit auf Proteinebene in der verwendeten b.End3-Zelllinie nachgewiesen werden. Da eine Lokalisation an der Plasmamembranoberfläche nahe lag, wurde für einen Teil der untersuchten Zellen auf die sonst übliche Permeabilisierung mit Triton X bei der Fixierung verzichtet.

Expression der NR1-Untereinheit auf b.End3

Die Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie sind in Abbildung 11 gezeigt. Zur Darstellung der fluoreszierenden Areale wurde das grüne Fluoreszenzbild über eine Hellfeld-Aufnahme des gleichen Ausschnitts gelegt. Die eingesetzte Vergrößerung entspricht 60x.

Gegenüber den Kontrollen (ohne Erstantikörper, Abbildung 11D) weisen sowohl permeabilisierte als auch nicht-permeabilisierte Gruppen eine deutliche Fluoreszenz durch Antikörpermarkierung auf.

Ergebnisse

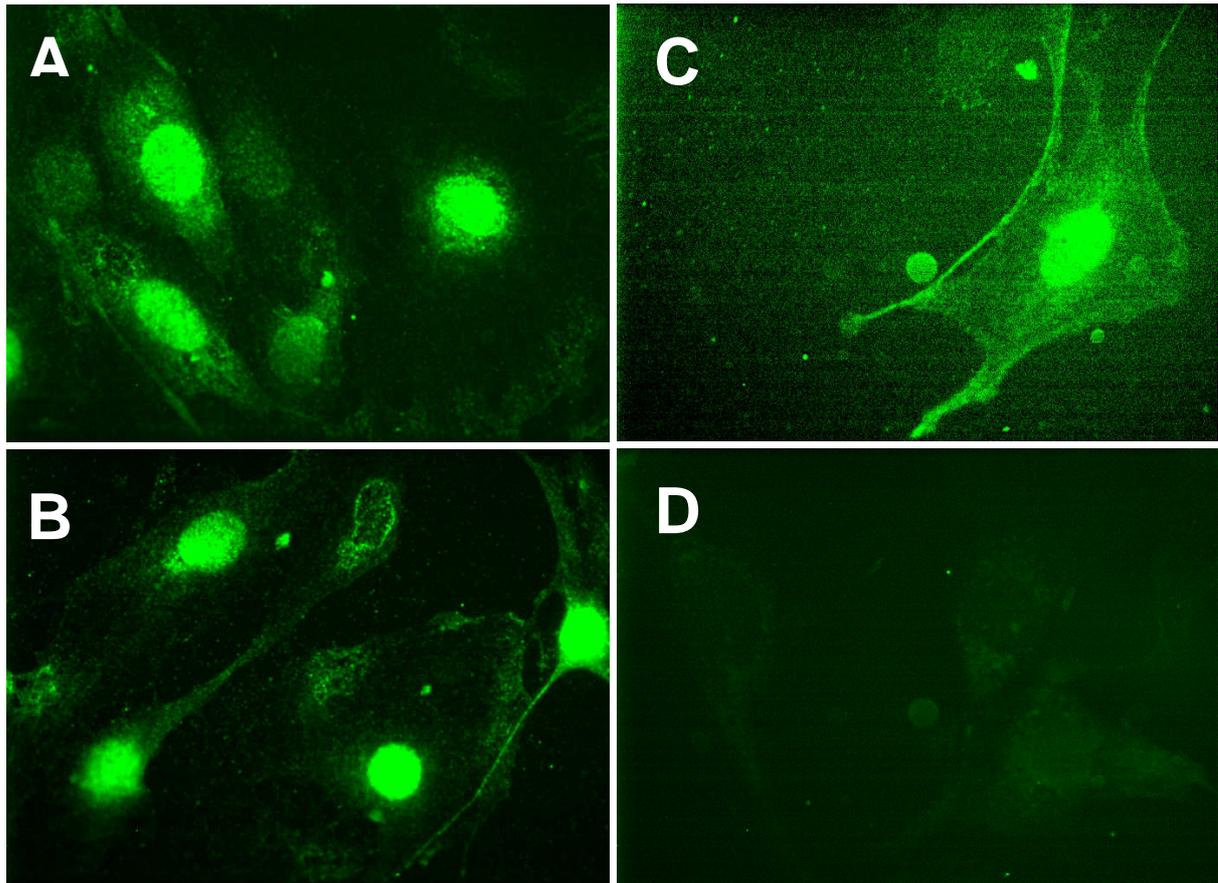


Abbildung 11:

A und B zeigen typische Zellfluoreszenz nach Antikörpermarkierung der NR1-Untereinheit ohne vorangehende Permeabilisierung mit Triton X. Abbildung C zeigt zum Vergleich eine Zelle der permeabilisierten Gruppe. Abbildung D zeigt die Kontrolle für den Zweitantikörper, die keine deutliche Fluoreszenz aufweist.

Ergebnisse

4.1.2. RT-PCR

Der Nachweis von mRNA, die die Produktion des NMDA-Rezeptors in den Zellen vermittelt, wurde mittels RT-PCR geführt. Verwandt wurden hierzu untereinheitenspezifische Primer, die gezielt die gewünschten Sequenzen, so im Zelllysate vorhanden, replizieren.

In der abschließenden Bandenauswertung der Replikationsprodukte zeigten sich die untersuchten bEnd3-Zellen positiv für mRNA der Untereinheiten NR1 (Abbildung 12) sowie der NR2-Subtypen NR2B-D (Abbildung 13).

4.1.2.1. Nachweis der NR1-Untereinheit

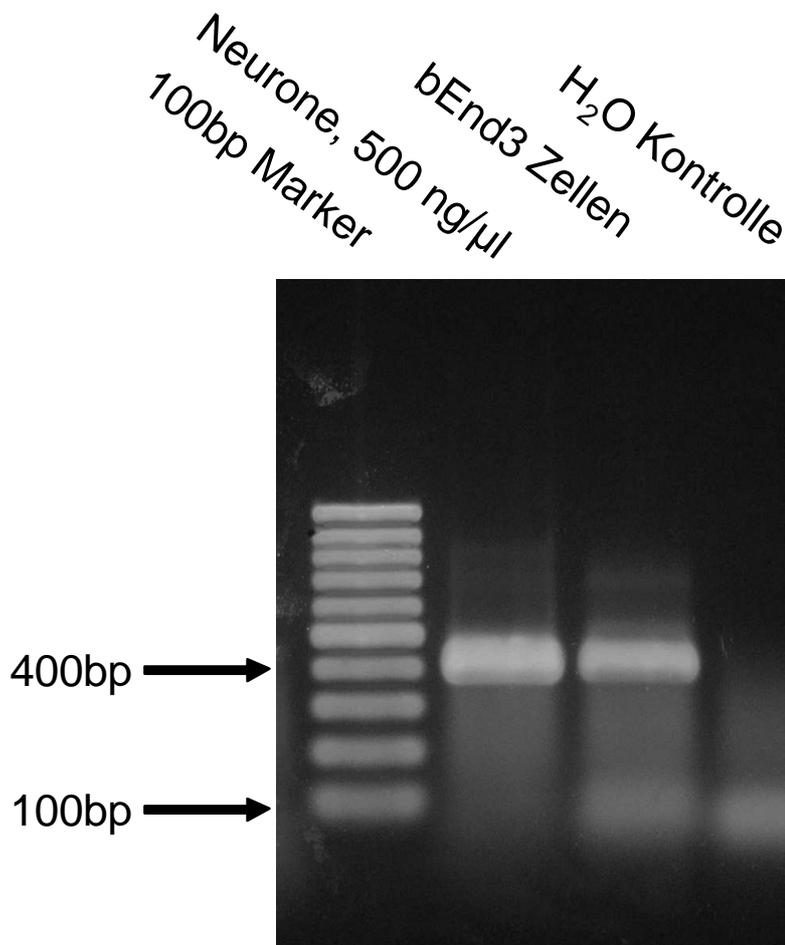


Abbildung 12: Das Gel zeigt die PCR-Produkte für spezifische Primer der NR1-Untereinheit der Positiv-Kontrolle (murine Neuronen), b.End3-Zellen und Negativ-Kontrolle (H₂O). Die Replikation der cDNA umfasste 45 Zyklen. Eine Skalen-Mischung von Nukleotidfragmenten (links) in einer Staffelung von 100 Basenpaaren dient der Größeneinschätzung der replizierten Fragmente durch Lagevergleich der Banden.

Ergebnisse

4.1.2.2. Nachweis der Untereinheiten NR2 B-D

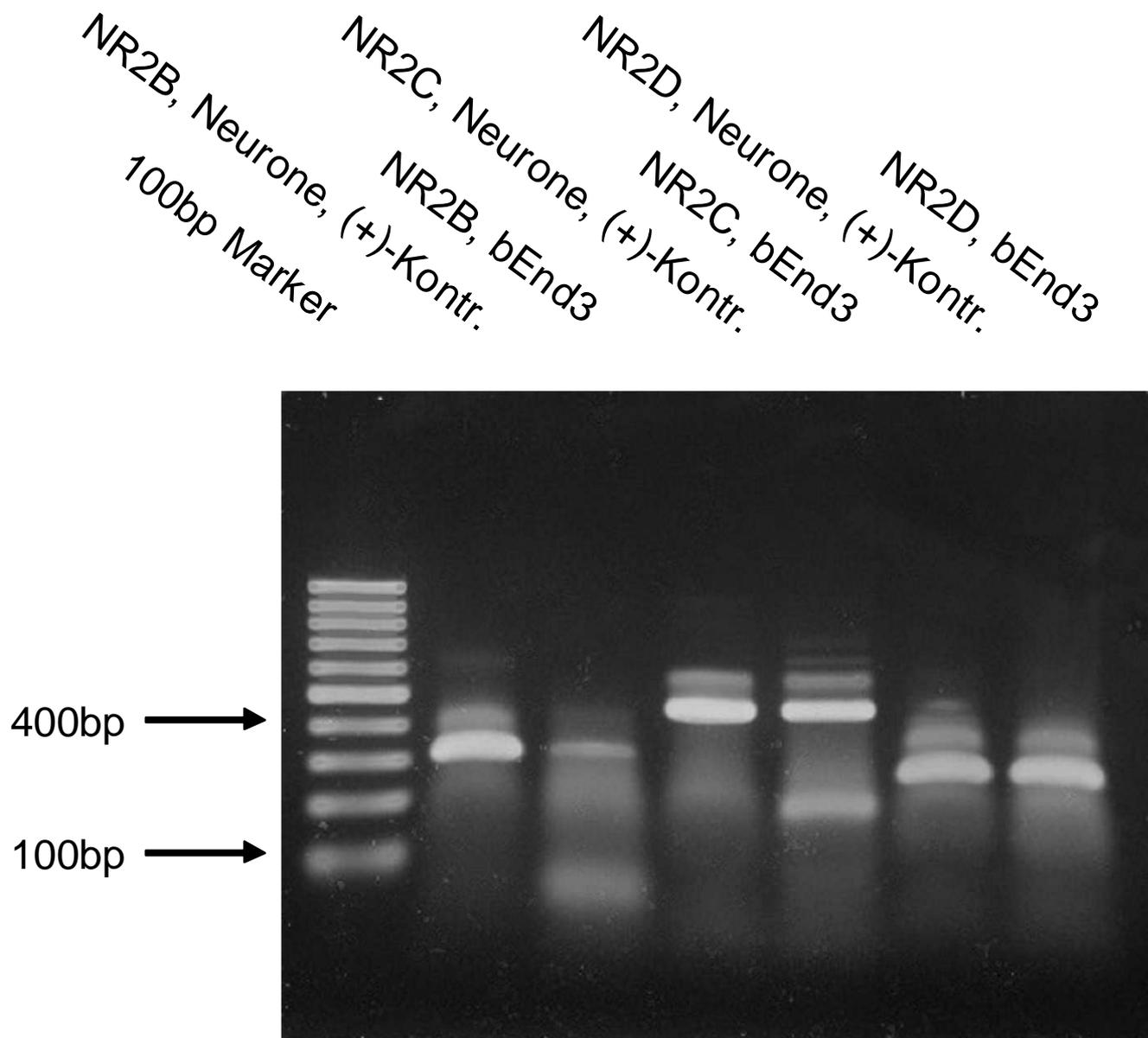


Abbildung 13: Die PCR-Produkte für Primer der Untereinheiten NR2 B-D der Positiv-Kontrolle (murine Neuronen) und b.End3-Zellen. Es wurden 30 Zyklen eingesetzt. Der Vergleich mit der Skala zeigt gute Übereinstimmung der Fragmentgrößen mit Literaturwerten (NR2B-Fragment: 314bp, NR2C-Fragment: 464bp, NR2D-Fragment: 265bp) (128)

Ergebnisse

4.2. NMDA-Rezeptorexpression nach ROS-Exposition

Die folgenden Experimente dienen der Untersuchung einer veränderten NMDA-Rezeptorexpression auf Endothelzellen nach Exposition gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies.

4.2.1. In-Cell Western

In diesen Versuchen wurde die Proteinexpression der NR1-Untereinheit zu mehreren Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) nach ROS-Behandlung mittels fluoreszierender Antikörperbindung, normiert auf die Zellmenge (DNA-Gehalt), untersucht. Es zeigte sich für alle ROS-exponierten Gruppen gegenüber der Kontrolle ein deutlicher, hoch signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der NR1-Expression nach spätestens 72 Stunden.

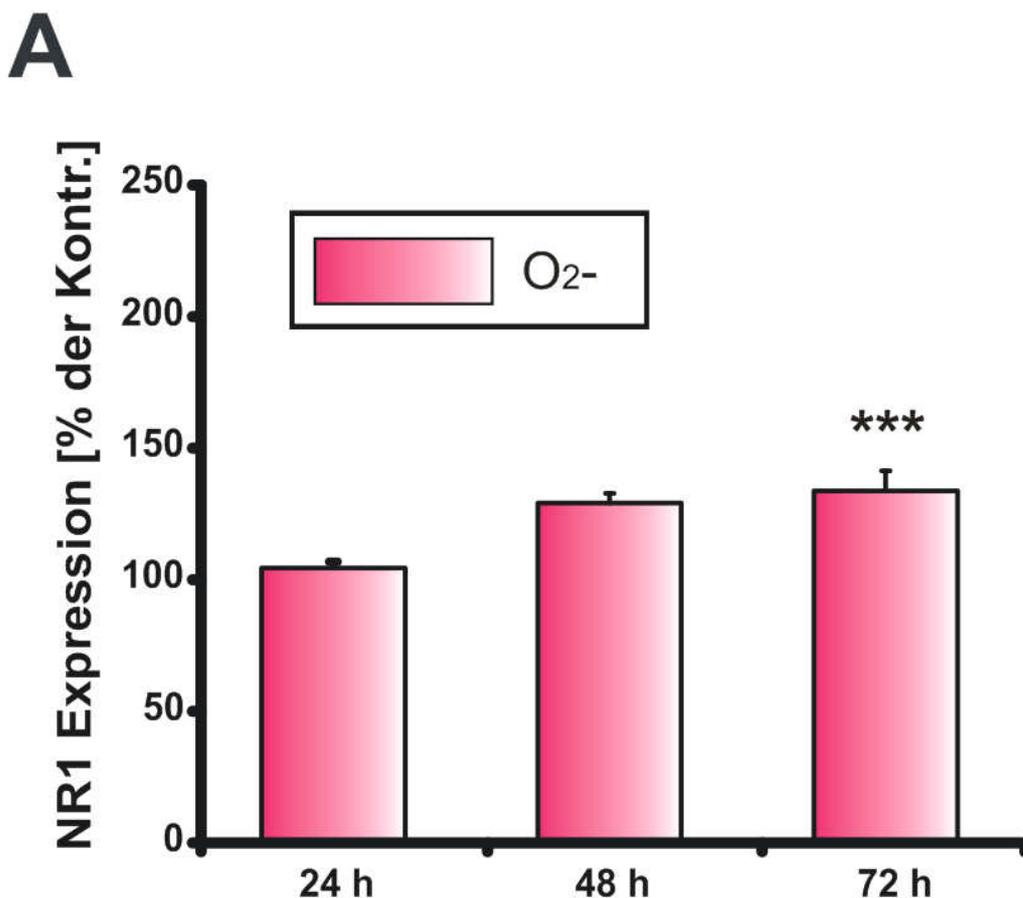


Abbildung 14: In-Cell Western (Stimulation mit O_2^-). Nach einer 30-minütiger Exposition gegenüber Superoxid steigt die Expression der NR1-Untereinheit und erreicht nach 72h hochsignifikante Werte (% der unbehandelten Kontrolle; *** $p < 0,001$, $n = 8$; 72 h: $133,83 \pm 7,51$ %)

B

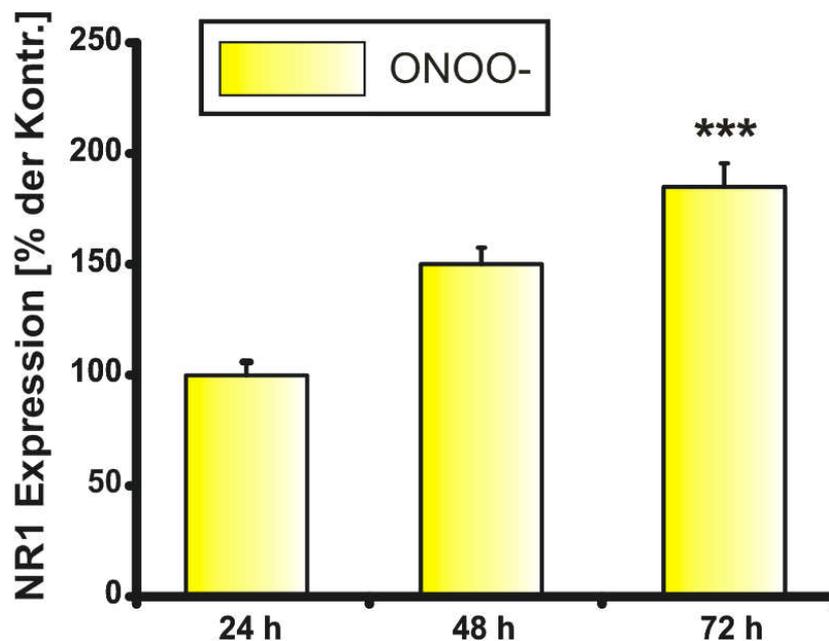


Abbildung 15: In-Cell Western (Stimulation mit ONOO-). Nach Kontakt mit Stickstoffperoxid für 30 Minuten erreicht die Expression der NR1-Untereinheit nach 72h hochsignifikante Werte (% der unbehandelten Kontrolle; *** $p < 0,001$, $n = 8$; 72 h: 184,85 +/- 10.68 %)

C

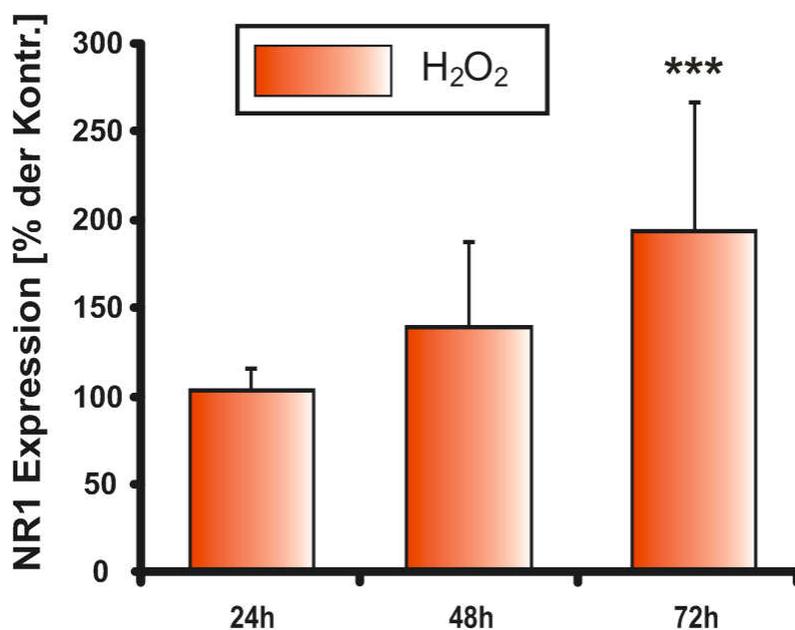


Abbildung 16: In-Cell Western (Stimulation mit H₂O₂). Ebenso steigt die Expression der NR1-Untereinheit nach 30-minütiger Inkubation mit Wasserstoffperoxid, die Steigerung nach 72h ist hochsignifikant (% der unbehandelten Kontrolle; *** $p < 0,001$, $n = 8$; 72 h: 192,84 +/- 74,58%)

Ergebnisse

4.2.2. Fluoreszenz-Messungen

Die Verwendung des membranpotentialsensitiven Farbstoffindikators DiBAC ermöglichte eine zeitnahe Untersuchung der Aktivierung des ionotropen NMDA-Rezeptors auf radikalexponierten Zellen. Eine Fluoreszenzsteigerung ist dabei Ausdruck einer Depolarisierung des Membranpotentials durch kanalgetragene Ionenströme, wie in 3.6.1 beschrieben.

Die Zellen wurden für 30 Minuten gegenüber den Sauerstoffradikalen H_2O_2 , O_2^- oder ONOO^- exponiert. Nach einer 72-stündigen Latenz im Inkubator erfolgte die Stimulation mit NMDA verschiedener Konzentrationen (0,1 / 0,5 / 1,0 und 2,5 mmol/l NMDA).

Dabei zeigte sich im Vergleich mit den nicht-exponierten Zellen für alle radikalexponierten Gruppen eine deutlich stärker ausgeprägte Fluoreszenzsteigerung, bezogen auf die jeweils gleich vorbehandelten, NMDA-unstimulierten Kontrollen. Dieser Effekt, der bereits bei niedrigen NMDA-Konzentrationen hochsignifikant war, deutet auf eine deutlich höhere NMDA-vermittelte Rezeptoraktivierung in den vorbehandelten Zellen hin. Diese Beobachtung korrespondiert gut mit den mittels In-Cell Western durchgeführten Rezeptorexpressionsstudien.

Ergebnisse

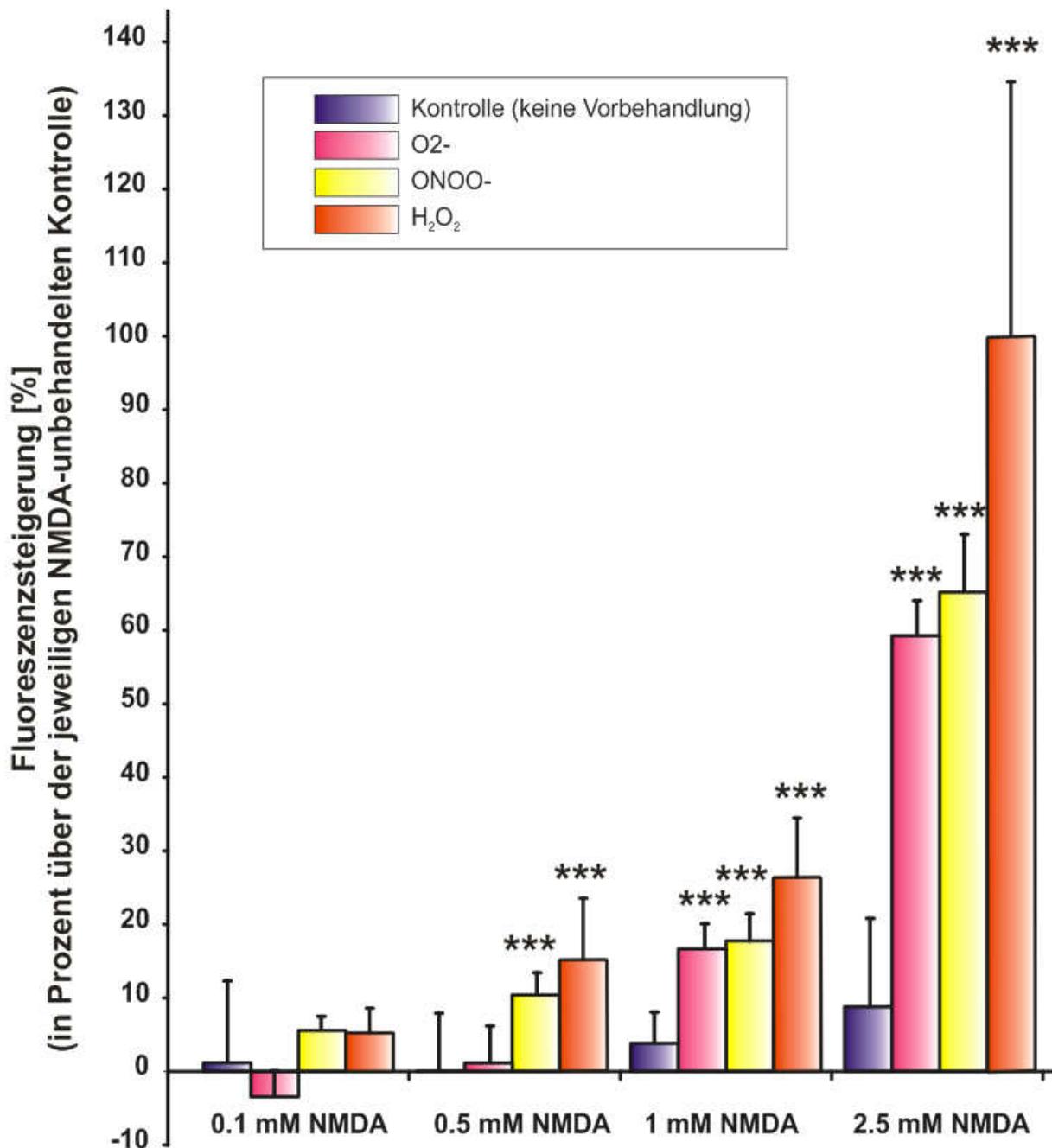


Abbildung 17: Fluoreszenzmessungen mit dem membranpotentialsensitiven Farbstoff DiBAC. Nach 30-minütiger Radikalexposition und anschließender 72-stündiger Inkubation wurde mit verschiedenen NMDA-Konzentrationen stimuliert. Dargestellt sind die Messwerte für $t = 30$ min nach Stimulation als prozentuale Fluoreszenzsteigerung über derjenigen der jeweiligen NMDA-unbehandelten Kontrolle, bezogen auf den Zeitpunkt $t = 0$ vor Stimulation. (***) $p < 0.001$; $n=8$)

Ergebnisse

4.3. Auswirkungen von ROS auf die Endothelintegrität nach NMDA-Rezeptoraktivierung

Um zu untersuchen, ob die Änderung der NMDA-Rezeptorexpression nach Sauerstoffradikal-Exposition einen Einfluss auf die Endothelintegrität unter NMDA-Rezeptoraktivierung ausübt, wurde das ECIS-System zur Messung der Monolayer-Impedanz über einen Zeitverlauf eingesetzt.

4.3.1. Plateaubildung

Nach Aussaat auf dem ECIS-Chip beginnt mit dem Anwachsen der Zellen die Bildung eines konfluenten Monolayers, der den Strom von Ionen zwischen den Elektroden zunehmend einschränkt und zu einer Impedanzerhöhung führt. Nach ca. 36 Stunden erreichte diese Impedanzänderung in allen untersuchten Gruppen zusehends ein Plateau, die Zellen bildeten einen konfluenten Monolayer. Nach 48 Stunden erfolgte in diesem Zustand die Zugabe des Rezeptorstimulans NMDA.

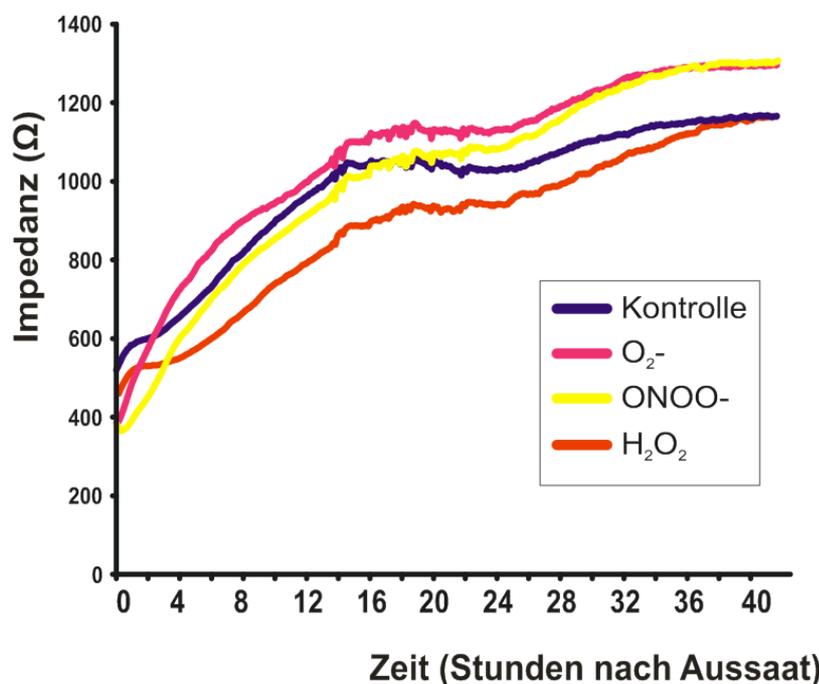


Abbildung 18: Anwachsen der Zellen auf dem ECIS-Chip. Mit zunehmender Zellzahl und Monolayerbildung steigt die gemessene Impedanz durch Einschränkung des Ionenflusses zwischen den Messelektroden. Nach 36 Stunden ist ein Plateau erreicht, das Ausdruck in der abflachenden Wachstumskurve des Zellrasens findet. Artefakte und Wachstumsverzögerung bei 16-20 Stunden sind Ausdruck des Arbeitsbetriebs am Brutschrank. Dargestellt sind exemplarisch gemittelte (n=4) Wachstumsverläufe der jeweiligen Gruppen.

Ergebnisse

4.3.2. Impedanzänderung

Unter Stimulation mit 2,5 mmol/l NMDA zeigte sich bei den zuvor radikalexponierten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ein Impedanzabfall bezogen auf den Zeitpunkt unmittelbar vor Zugabe, der 24 Stunden nach NMDA-Stimulation für ONOO^- und H_2O_2 signifikant bzw. hochsignifikant war.

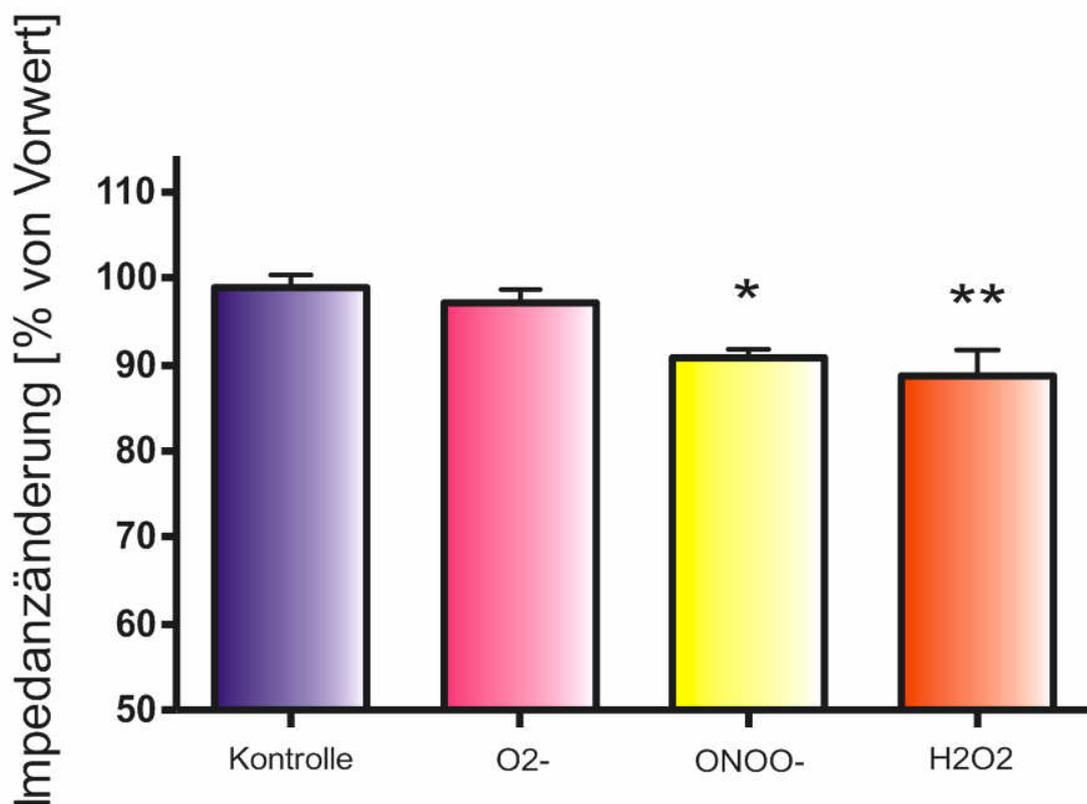


Abbildung 19: ECIS Impedanzänderung 24h nach NMDA-Stimulation. Die vor Aussaat 30 min radikalexponierten Zellen wurden vor NMDA-Zugabe 48h auf den ECIS-Chips kultiviert. (Kontrolle: 99,11 +/- 1,37%, O₂⁻: 97,56 +/- 1,07%, p > 0,05; ONOO⁻: 91,00 +/- 0,66%, *p < 0,05; H₂O₂: 88,89 +/- 2,89%, **p < 0,01; je n = 4)

Diskussion

5. Diskussion

5.1. NMDA-Rezeptoren auf zerebrovaskulärem Endothel und bEnd3-Zellen

Der Nachweis des NMDA-Rezeptors auf zerebrovaskulären Endothelzellen war von einigen Gruppen in Frage gestellt worden, konnte jedoch durch die vorliegenden Untersuchungen weiter erhärtet und der Rezeptor in seiner Komposition auf der bEnd3-Zelllinie weiter charakterisiert werden.

War zunächst das Konzept funktioneller Glutamat-Rezeptoren auf nicht-erregbaren Hirnendothelzellen bei Mensch, Maus und Ratte umstritten – einige Autoren traten Gegenbeweise an (84;85;129) – so konnte doch in den letzten Jahren in einer Reihe von Experimenten verschiedener Arbeitsgruppen die Existenz und potentielle Bedeutung dieser Rezeptoren in vielfältigen neuropathologischen Zusammenhängen aufgezeigt werden (83;86-88;93;130-132). Koenig *et al.* demonstrierten in Versuchen an Präparationen von Hirnkapillaren der Ratte, dass ein kryogener Integritätsverlust der BHS durch Inhibition von NMDA-Rezeptoren mit MK-801 verhindert wird, wohingegen der Agonist NMDA in anderen Versuchen zu einer erhöhten Permeabilität der BHS führte. Mittels RT-PCR wiesen Krizbai *et al.* Transkripte für NR1, NR2A-C sowie AMPA und metabotrope Glutamatrezeptoren in einer primären Rattenhirnendothelzelllinie nach und beobachteten eine Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II nach Exposition gegenüber Glutamat. St'astny *et al.* gelang ebenfalls der RT-PCR gestützte Nachweis für NR1 und AMPA-Rezeptoruntereinheiten von frisch isolierten Kapillaren aus sieben verschiedenen Hirnregionen; zusätzlich gestützt wurde dieser Nachweis durch Bindungsstudien mit [³H]Glutamat, das durch NMDA, AMPA und metabotrope Rezeptoragonisten aus seiner Bindung an NMDA-Rezeptoren der isolierten Kapillaren verdrängt werden konnte. Collard *et al.* wies im Rattenmodell mittels RT-PCR und komplementärer Techniken verschiedene metabotrope Rezeptoren (mGlu) nach und demonstrierte ihre Funktionalität durch den Einsatz spezifischer Agonisten. Ebenso konnten von Parfenova *et al.* mittels Radioligandenbindung und Immunoblotting Hinweise für die Anwesenheit ionotroper, jedoch nicht metabotroper Glutamatrezeptoren in dieser Lokalisation am neugeborenen Schwein erbracht werden. Sharp *et al.* gelang an humanen Hirnendothelzellen die Darstellung eines funktionellen NMDA-Rezeptors mittels Western-Blot und RT-PCR; ein durch Glutamat oder

Diskussion

NMDA herbeigeführter Abfall der TEER konnte durch MK801 und Ca^{2+} -Inhibitoren sowie Antioxidantien signifikant reduziert werden. Neuere Arbeiten von Minagar *et al.* zeigten, dass die spezifische Stimulation von NMDA-Rezeptoren humaner zerebraler Endothelzellen Einflüsse auf die Proteinexpression hat.

Erste Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Scott konnten Hinweise für die Expression des NMDA-Rezeptors auf murinen zerebrovaskulären Endothelzellen der bEnd3-Reihe erbringen. Dort waren aus Zelllysaten mittels Western-Blot-Technik Fraktionen isoliert worden, die mit den NR1- und NR2A/B-Untereinheiten korrespondieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung im bEnd3-Modell weiter erhärtet werden und darüber hinaus weitere beteiligte Untereinheiten ausgemacht werden. Der Expressionsnachweis der obligatorischen NR1-Untereinheit konnte immunohistologisch sowohl an permeabilisierten als auch nicht-permeabilisierten Zellen erbracht werden. Letzteres spricht für die funktionelle Lokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran. Ebenso konnte mittels RT-PCR Technik spezifische mRNA für die NR1 sowie, neben NR2B, für die Untereinheiten NR2C und NR2D nachgewiesen werden. Diese Befunde legen eine heterogene Komposition der exprimierten NMDA-Rezeptoren nahe, wie sie von Krizbai *et al.* auch für primäre Zellkulturen beschrieben wurde (83).

5.2. Oxidativer Stress erhöht endotheliale NMDA-Rezeptorexpression

Auf der Grundlage der vielfach beobachteten Wechselwirkungen zwischen oxidativem Stress und dem NMDA-Rezeptor pathway wurde untersucht, ob ROS an der Modulation der NMDA-Rezeptorexpression beteiligt sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid, Superoxid und Peroxynitrit zu einer Hochregulation des Rezeptors kommt.

Die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist vielfach im Zentrum verschiedener neuropathologischer Prozesse beobachtet worden, deren Endstrecke neben einer direkten neuronalen Schädigung in der Öffnung oder Kompromittierung der BHS mündet und zu vasogenen Ödemen mit nachfolgender weitergehender Zerstörung neuronalen Gewebes führen kann (133;133-135).

Diskussion

Dabei weisen unterschiedliche diskutierte Mechanismen wie das Kinin-System, mitochondriale Dysfunktion, Rekrutierung von Neutrophilen, Freisetzung von Interleukinen und Exzitotoxizität eine gemeinsame Endstrecke in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auf, denen wiederum eine Schlüsselrolle in der Modifikation von tight junction Proteinen, Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen und oxidativer Schädigung zur Öffnung der BHS zukommt (136). Auch der NMDA-Rezeptor wurde als ein Aktivator einer solchen pathologisch relevanten ROS-Generierung mit nachfolgender endothelialer Dysfunktion im Sinne einer erhöhten BHS-Permeabilität ausgemacht (96). Dabei legen die in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen mit Inhibitoren nahe, dass zur Entstehung der nachgewiesenen ROS unterschiedliche Quellen wie die NADPH-Oxidase, Cytochrom P450 sowie die mitochondriale Atmungskette beitragen.

Als sekundäre oder tertiäre Botenstoffe greifen ROS in Stoffwechselwege ein und regulieren Proteinphosphatasen, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, beispielhaft für das große Aktionspotential dieser Metabolite (137).

Wechselwirkende Interaktionen zwischen ROS und dem glutamatergen System, im Speziellen dem NMDA-Rezeptor, sind bekannt aus der Erforschung der zu Grunde liegenden Mechanismen der Long-Term Potentiation (LTP) (138), einem neurophysiologisches Korrelat für Lernvorgänge im ZNS, experimentellen Arbeiten zur Pathogenese neuropathischer Schmerzen (139) und sind in der Diskussion als Teil einer Sensibilisierungsreaktion bei Multiple Chemical Sensitivity und verwandten Erkrankungen mit bislang ungeklärter Ätiologie (140).

Schließlich finden sich Hinweise auf einen Einfluss von ROS auf das Expressionsmuster des NMDA-Rezeptors im Tiermodell des ischämischen Reperfusionsschadens bei Schlaganfall sowie der intrazerebralen Blutung (141;142).

Arbeiten der Gruppen um Knapp und Klann weisen darauf hin, dass ROS in der Rolle eines second messengers wesentlich an der vom NMDA-Rezeptor getragenen Induktion des LTP beteiligt sind (143-146). Dabei konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Ausbildung von LTP durch ROS, v.a. Superoxid, mit einer Aktivitätszunahme der Proteinkinase C (PKC) korreliert ist. Diese ist unter anderem auch an der Regulation des Aktivitätszustandes synaptischer NMDA-Rezeptoren beteiligt (147). Es erscheint daher denkbar, dass ROS im Rahmen synaptischer Plastizität rückkoppelnd Einfluss auf die Sensitivität der beteiligten NMDA-Rezeptoren nehmen.

Ähnliche Mechanismen finden sich auch bei der Pathogenese neuropathischer Schmerzen. Hier kommen Untersuchungen von Gao *et al.* zu dem Ergebnis, dass eine ROS-vermittelte

Diskussion

Phosphorylierung zur Aktivierung spinaler NMDA-Rezeptoren und gesteigerter Schmerzwahrnehmung führt. Systemische Gabe von Phenyl-N-t-butyl Nitron (PBN), einem Radikalfänger, verhinderte im Tiermodell einen Anstieg phosphorylierter NR1-Untereinheiten im Rückenmark und ging mit einer verminderten Schmerzsensibilisierung einher. Die Expression unphosphorylierter NR1-Einheiten blieb jedoch in allen untersuchten Gruppen unverändert (139).

Weiterhin könnten Wechselwirkungen zwischen ROS und NMDA-Rezeptoren zur Sensibilisierung gegenüber hydrophoben Chemikalien beitragen, wie dies bei dem Krankheitsbild der Multiple Chemical Sensitivity (MCS) diskutiert wird. Eine Arbeitshypothese von Pall *et al.* etwa geht davon aus, dass die Hemmung intrazellulärer Regulatorproteine, die eine Bindungstasche für hydrophobe Substanzen aufweisen, zur vermehrten Aktivität NO-produzierender Enzyme wie nNOS führt. Als überschießend freigesetztes retrogrades Signalmolekül vermittelte NO so präsynaptisch eine vermehrte Ausschüttung von Glutamat, während die postsynaptische Bildung von Peroxynitrit zu ATP-Depletion und Sensitivierung der NMDA-Rezeptoren durch Verlust des polarisationsabhängigen Mg^{2+} -Blocks führen würde. Auf diese Weise würde ein Überschuss an ROS die Aktivität des synaptischen NMDA-Rezeptorsystems empfindlich steigern (140).

Schließlich wird ein Zusammenhang zwischen der Expressionsregulation von NMDA-Rezeptoren und oxidativem Stress nahegelegt in tierexperimentellen Untersuchungen der ischämischen oder haemorrhagischen Hirnschädigung. Won *et al.* untersuchten die Korrelation von oxidativem DNA-Schaden nach Reperfusion einer ischämischen Läsion in der Ratte und fanden eine damit einhergehende deutlich erhöhte Expression von NR1 und NR2 Untereinheiten 30 Minuten nach Reperfusion. Während NR2 über den Zeitverlauf von 24 Stunden erhöht blieb, war die Expression von NR1 hingegen nach 3 Stunden bereits deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Won *et al.* postulierten einen protektiven Mechanismus, der dazu dienen könnte, exzitotoxischen Schaden zu reduzieren (142).

Zu ähnlichen Beobachtungen führten Untersuchungen am Rattenmodell der intrazerebralen Blutung durch Nakamura *et al.* Eine Stunde nach Setzen der Läsion fanden sie eine Zunahme der NR1 und NR2A Expression, die sich in Präparaten 24 und 72 Stunden nach Läsion in eine deutliche Herunterregulation umkehrte (141).

Neueste Daten zur Veränderung der Genexpression in der Retina unter Hypoxie/Reperfusion konnten für mehrere NMDA-Rezeptoruntereinheiten (NR1, NR2C-D) eine Zunahme der Genaktivität im Mikroarray (bis zu 6fach im Fall von NR1), Zunahme der Transkription in der quantitativen RT-PCR nach 3 und 24 Stunden sowie eine Aktivitätssteigerung von mit

Diskussion

dem NMDA-Rezeptor assoziierten Genen mittels Interaktom-Analyse nachweisen (148). In Untersuchungen der Ischämie ist ein Anstieg des oxidativen Stresses gut belegt (149), im Speziellen auch eine ROS-Produktion durch das Endothel selbst (150). Daher scheint eine Beteiligung von ROS an den beobachteten Veränderungen der NMDA-R-Expression in Zusammenschau mit den hier vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich.

Die genannten Untersuchungen zeigen, dass an Neuronen – möglicherweise „redox-sensitive“ – Mechanismen zur schnellen Regulation der NMDA-Rezeptorexpression existieren. Gestützt wird diese Vermutung durch die Erkenntnis, dass NR1 stark posttranskriptional reguliert werden und Lokalisation sowie Komposition der Rezeptorkomplexe vielfältigen Regulationsmechanismen unterliegen (151).

Neuere Daten von Minagar *et al.* schließlich geben Hinweise darauf, dass die erwähnten Signalwege direkten Einfluss auf die Proteinausstattung der Zelle, im Speziellen der Endothelzellen, haben. Sie belegen, dass die Aktivierung des NMDA-Rezeptors humaner zerebrovaskulärer Endothelzellen zu deutlichen Veränderungen des Proteoms führt, die durch den Rezeptorantagonisten MK801 unterdrückt werden können (132). Da ein wesentlicher second messenger der NMDA-Rezeptoraktivierung nun gerade die Generierung von ROS ist, erscheint es plausibel, dass ROS neben der von uns postulierten Wirkung auf die Rezeptorexpression auch an der Expressionssteuerung weiterer Proteine beteiligt sein könnten.

Nicht untersucht worden war bislang, ob und wenn ja, welchen Einfluss reaktive Sauerstoffspezies auf den NMDA-Rezeptor des zerebrovaskulären Endothels ausüben.

In Analogie zu den Untersuchungen an neuronalen NMDA-Rezeptoren wären prinzipiell zwei Möglichkeiten einer Beeinflussung in Betracht zu ziehen:

- ein Mechanismus der negativen Rückkopplung, um etwa die zelluläre Antwort auf eine zeitnahe glutamaterge Überstimulation zu beschränken, oder
- eine positiv rückkoppelnde Verstärkung der Reizantwort, die dann im Sinne eines *circulus vitiosus* die pathologische Entgleisung weiter vorantreibt und ein Schrankenversagen fördert.

Letztere Variante könnte möglicherweise weitere potentielle Angriffspunkte einer auf die Reduzierung der Radikalbildung gemünzten Therapiestrategie liefern. Darüber wäre in Betracht zu ziehen, dass die Propagierung exzitotoxischer Schädigungen im Hirngewebe zum Teil auch durch ROS getragen sein könnte, die durch Eingreifen in den NMDA-Rezeptor-

Diskussion

Signalweg die Suszeptibilität angrenzender Zellverbände gegenüber der Noxe Glutamat erhöhen.

In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit mittels der In-Cell Western Technik eine deutliche Zunahme der NMDA-Rezeptorexpression auf Proteinebene unter ROS-Einfluss beobachtet werden. Die Exposition der Zellen gegenüber O_2^- , $ONOO^-$ sowie H_2O_2 führte dabei jeweils zu ausgeprägter, nach 72 Stunden hochsignifikant gesteigerter Bildung von NR1-Untereinheiten.

In einem weiteren Schritt galt es zu sichern, dass es sich dabei um Anteile vermehrt in die Zellmembran eingebauter, funktionsfähiger Rezeptorkomplexe handelt. Die von uns erhobenen Daten der fluorometrischen Membranpotentialmessungen konnten diese Befunde stützen. Unter Vorinkubation mit den genannten ROS reagierten die Zellen nach 72h bereits bei geringeren Konzentrationen des rezeptorspezifischen Stimulans NMDA mit hochsignifikanter Fluoreszenzsteigerung, die für eine starke Aktivierung der vermehrt exprimierten NMDA-Rezeptoren spricht.

Aus diesen Ergebnissen kann folgender Schluss gezogen werden: ROS steigern die Expression von NMDA-Rezeptoren auf zerebrovaskulären Endothelzellen und führen auf diese Weise zu einer unter Stimulation gesteigerten Rezeptoraktivierung.

5.3. Vermehrte Rezeptorexpression durch oxidativen Stress verstärkt Glutamatwirkung auf die Blut-Hirn-Schranken-Integrität

Eine durch ROS-Wirkung erhöhte NMDA-Rezeptorexpression führte in den vorliegenden Experimenten zu einer Kompromittierung der Blut-Hirn-Schranke. In der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie Alzheimer oder Multipler Sklerose, in denen eine vermehrte Freisetzung von Glutamat und Generierung von ROS stattfindet, könnte eine solche oxidative Sensitivierung für glutamaterge Reize wesentlich zum dort beobachteten schädigenden Schrankenversagen beitragen.

Diskussion

Unter physiologischen Bedingungen schützt die intakte Blut-Hirn-Schranke das empfindliche neuronale Gewebe, sorgt für die zur Funktionserhaltung notwendige Homöostase von Elektrolyten und Metaboliten und hindert pathogene Keime an einem Übertritt aus der Blutbahn. Intuitiv erschließt sich daher die Annahme, dass eine Störung der BHS zu einer Schädigung des ZNS und einer Verschlechterung bereits bestehender zentralnervöser Erkrankungen führen kann. Tatsächlich lässt sich ein Versagen der BHS in vielen Neuropathologien nachweisen. Eine wichtige Rolle spielt es etwa in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS), bei der es zur Extravasation aktivierter Leukozyten über die kompromittierte BHS kommt (152). Untersuchungen an der Experimentellen Autoimmunenzenzephalitis (EAE), einem Tiermodell der MS, weisen darauf hin, dass Peroxynitrit als wesentlicher Mediator des Schrankenversagens fungiert (153;154). Neuere Daten von Scott *et al.* zeigen, dass durch Aktivierung von endothelialen NMDA-Rezeptoren (nicht jedoch AMPA/Kainat-Rezeptoren) größere Mengen von Peroxynitrit generiert werden (88). Dies deckt sich mit Beobachtungen von Sharp *et al.*, die NMDA-Rezeptor-getragenes Schrankenversagen an humanen Endothelzellen nachweisen konnten (86).

Bei der Alzheimer Demenz ist ein Schrankenversagen in einer großen Subgruppe der Patienten (22%) nachweisbar und dort mit einem schwereren Krankheitsverlauf korreliert (155). Studien von Paul *et al.* und Görgülü *et al.* legen nahe, dass Memantin, ein in der Alzheimertherapie eingesetzter NMDA-Rezeptorblocker, möglicherweise auch an der Blut-Hirn-Schranke eine therapeutische Wirkung entfaltet. Sie hatten gezeigt, dass Memantin im Tiermodell der Multiplen Sklerose und der zerebralen Ischämie-Reperfusion in der Lage ist, ein Schrankenversagen zu verhindern (156;157).

Eine weitere wichtige Rolle scheint Glutamat-assoziiertes Versagen der BHS bei traumatischer und ischämischer Hirnschädigung einzunehmen. Hier kommt es nach der Hypothese der Exzitotoxizität durch direkte neuronale Schädigung und Energiedepletion zum Versagen von Transportern und Freisetzung gespeicherten Glutamats mit folgendem interstitiellen Überschuss von Glutamat (158). Untersuchungen an Kokulturen konnten eine Freisetzung von Glutamat aus Astroglia unter Hypoxie/Reperfusion nachweisen. Gleichzeitig gemessene erhöhte ROS-Konzentrationen und ein begleitender TEER-Abfall ließen sich durch Gabe von MK801 oder Apocynin, einen spezifischen Inhibitor der NADPH-Oxidase, aufheben (159). Dieses Modell unterstützt die These, dass eine BHS-Dysfunktion unter den Bedingungen der Ischämie durch ROS vermittelt wird, deren Generierung möglicherweise durch freigesetztes Glutamat angestoßen wird. *In vivo* könnte zusätzlich neben dem von Glia

Diskussion

und untergehenden Neuronen abgegebenen Glutamat auch solches, welches im Rahmen von begleitenden Entzündungsprozessen von Granulozyten freigesetzt wird, zur BHS-Dysfunktion beitragen (130).

Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an b.End3-Monokulturen konnten jedoch keine Hochregulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat alleine nachweisen, obwohl hierdurch endotheliale ROS nachweislich generiert worden waren (160). Dies spricht zumindest in dem gewählten Modell gegen eine einfache Feedback-Schleife der Glutamatwirkung (Glutamat \uparrow \rightarrow ROS \uparrow \rightarrow Glutamat-Rezeptor \uparrow) auf Ebene des Endothels.

Die Wirkkette glutamatergen Schrankenversagens ist für ionotrope wie metabotrope Rezeptoren durch verschiedene Arbeiten beleuchtet worden. Koenig *et al.* konnte am Rattenmodell *in vivo* die BHS-permeabilisierende Wirkung von NMDA aufzeigen, die sich durch spezifische Antagonisten blockieren ließ (93). Dieser Effekt ließ sich von Sharp *et al.* auch *in vitro* für humane zerebrovaskuläre Endothelzellen nachweisen (86). Hier konnte unter NMDA- und Glutamat-Exposition ein antagonisierbarer, deutlicher Abfall des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) beobachtet werden. Collard *et al.* demonstrierten *in vitro* und *in vivo* die Wirksamkeit von Antagonisten metabotroper Glutamatrezeptoren vom Typ I und III zur Unterbindung glutamatergen Schrankenversagens (130). Eine direkte Stimulierung dieser metabotropen Rezeptoren mit spezifischen Agonisten führte jedoch in den TEER-Experimenten von Sharp *et al.* zu keinem signifikanten Abfall der Barriere, wie er dort bei NMDA oder Glutamat beobachtet worden waren (86).

Untersuchungen von Parfenova *et al.* und Sharp *et al.* legen die Generierung von ROS als intrazellulären Boten der glutamatergen Rezeptorstimulation, die für neuronale Zellen bereits gut untersucht ist (161), auch für das vaskuläre Endothel nahe (96;162). Deren destabilisierende Wirkung auf die BHS ist verschiedenen Mechanismen zuzurechnen: durch den Anstieg von ROS kommt es zur Aktivierung des kontraktiven Zellapparats über eine phosphorylierende Aktivierung der Myosin-Leichtketten (MLC), zur Aktivierung von degradierenden Metallomatrixproteinen und zur Herunterregulation und Umverteilung von „Tight junction“-Proteinen und eventuell weiteren parazellulären Verschlusskontakten (163-166).

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse scheint es gerechtfertigt anzunehmen, dass eine Zunahme der NMDA-Rezeptor-Aktivierung, sei es durch höhere Konzentrationen des

Diskussion

Liganden oder durch eine Vermehrung aktivierbarer Rezeptoren, zu einer erhöhten ROS-Produktion und nachfolgend stärkerer Kompromittierung der BHS-Integrität führen würde.

Es sollte nun daher in der vorliegenden Arbeit weiter ergründet werden, ob sich die Expressionszunahme des NMDA-Rezeptors bei gleichem Stimulus in eine vermehrte Änderung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität übersetzt. Hierzu wurde mittels des ECIS-Systems die Integrität eines NMDA-stimulierten Monolayers von bEnd3-Zellen untersucht, die vor Aussaat radikal exponiert worden waren. Wie aus dem Erreichen der Plateaukurven in Abbildung 18 beispielhaft ersichtlich ist, zeigte die vorübergehende Exposition gegenüber den Radikalen im Vergleich mit der Kontrollgruppe nach 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Wachstumsverhalten und Monolayerbildung. Unter der anschließenden Stimulation mit NMDA konnte jedoch nach 24 Stunden im Gegensatz zur Kontrolle ein im Falle von ONOO⁻ und H₂O₂ signifikanter bzw. hochsignifikanter Abfall der Impedanz beobachtet werden. Dieser lässt auf eine gesteigerte Suszeptibilität der Zellen für den Reiz und nachfolgend größere Auswirkungen auf die BHS-Permeabilität schließen.

Messungen der Gruppe Sharp *et al.* hatten bereits 2 Stunden nach Exposition von humanen Endothelzellen gegenüber 1 mM Glutamat oder NMDA signifikante Abfälle der TEER ergeben (86). Die von uns ermittelte Impedanzänderung via ECIS zeigte hingegen einen trägeren Zeitverlauf, dessen Abfall erst nach vielen Stunden signifikant war. Möglicherweise ist diese Diskrepanz der unterschiedlichen Messtechnik anzuschulden. Denkbar sind auch speziesspezifische Unterschiede im Ansprechverhalten; Untersuchungen zur Toleranz der bEnd3 gegenüber auch hohen Glutamatkonzentrationen weisen die Mäusehirnendothelzelllinie als relativ „resistent“ aus (88). Dies könnte auch zur Erklärung der geringen Wirkung von NMDA auf die nicht-ROS-exponierte Kontrolle im ECIS Versuch beitragen.

In Zusammenschau mit den vorangegangenen Experimenten lässt sich aus diesen Ergebnissen folgender Schluss ziehen: Radikal exponiertes zerebrovaskuläres Endothel zeigt eine deutliche Zunahme des NMDA-Rezeptorenbesatzes und damit einhergehend ein ausgeprägteres Ansprechen auf Rezeptorstimulation, was wiederum in einen stärkeren Abfall der BHS-Integrität mündet.

Diskussion

5.4. Formulierung der Hypothese

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen folgende Hypothese aufstellen:

Unter Bedingungen des oxidativen Stresses kommt es auf vaskulären Hirnendothelzellen zu einer Hochregulation funktionsfähiger NMDA-Rezeptoren, die geeignet ist, das Endothel gegenüber den barrierschädigenden Wirkungen von Glutamat zu sensibilisieren. Dies könnte einen neuen Pathomechanismus darstellen, der zum Zusammenbruch der BHS unter den kombinierten oxidativen und exzitotoxischen Bedingungen vieler Neuropathologien beiträgt. Auch physiologisch könnte die ROS-gesteuerte Regulation des NMDA-Rezeptors eine Funktion erfüllen. Koenig *et al.* formulierten die Hypothese, NMDA-Rezeptoren auf zerebrovaskulärem Endothel könnten physiologischerweise den kapillären Transport von Nährstoffen und deren Diffusion ins Hirngewebe an den Grad neuronaler Erregung koppeln und so eine bedarfsorientierte Modulation der BHS herbeiführen (93). In Weiterführung dieser Annahme wäre auch denkbar, dass ebenso ROS, die durch vermehrte neuronale Aktivität generiert werden, durch Hochregulation des endothelialen NMDA-Rezeptors zu einer Permeabilisierung der Schranke und Verbesserung der lokalen nutritiven Situation beitragen.

Diskussion

5.5. Kritische Würdigung/Einschränkungen

Zur verwendeten Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass oxidativer Stress einen Einfluss auf die Expression von NR1-Untereinheiten auf Endothelzellen hat. Als Modell der Blut-Hirn-Schranke dienten hierzu Monolayer-Kulturen der b.End3-Zelllinie. Dabei handelt es sich um zerebrale Endothelzellen aus der Maus, die mittels des Polyoma Middle T Antigen Virus transformiert wurden. Diese so immortalisierte Zelllinie behält *in vitro* viele der Eigenschaften, die charakteristisch für primäre Endothelzellen sind. Gegenüber primären Zellkulturen scheint sie sogar besser die zytosolische Lokalisation der verschlusskontaktassoziierten Proteine Occludin und Zona occludin-1 sowie die Expression von iNOS und eNOS zu bewahren (167;168). Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der bEnd3-Reihe zeigen, dass verschiedene endothel-spezifische Proteine wie PECAM-1, Endoglin, MECA-32 und Flk-1 exprimiert werden. Darüber hinaus reagieren die Zellen auf inflammatorische Zytokine mit einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (169-174) und weisen einen Besatz mit dem NMDA-Rezeptor und eine davon abhängige Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies Peroxynitrit und Stickstoffmonoxid auf (88).

Weitere BHS-charakteristische Eigenschaften umfassen Morphologie sowie verschiedene Transportersysteme wie den P-glykoprotein Effluxtransporter, Glucose- und Aminosäuretransporter.

Mono- und Kokulturen mit C6-Astroglia zeigten jedoch in Untersuchungen von Omid *et al.* nur geringe TEER Widerstandswerte von max. 130 Ohm · cm² und schwach ausgeprägte Abdichtung gegenüber parazellulärer Stoffdiffusion (175). In vergleichbaren Experimenten von Sharp *et al.* wurden mit sekundären humanen Hirnendothelzellen in Monokultur Werte von max. 259 Ohm · 0.33cm² erreicht.

Für die in unseren Experimenten verwendete ECIS-Technik liegen bisher keine Referenzwerte für Kulturen von Hirnendothelzellen vor. Arbeiten, die gemessene Widerstände nach TEER- und ECIS-Methode vergleichen, zeigen eine nur eingeschränkte Vergleichbarkeit der Messmethoden auf (176).

Diskussion

Obwohl auch unter den in der vorliegenden Arbeit gegebenen Konditionen unter NMDA-Rezeptorstimulation ein Abfall der Endothelimpedanz gemessen werden konnte, wäre auch der Einsatz geeigneter Kokultursysteme denkbar. Die Ausbildung einer dichteren Barriere durch Wechselwirkung von Endothel und Gliazellen könnte die *in vivo* Situation möglicherweise besser modellieren.

Ob die Erkenntnisse aus den Experimenten an der bEnd3-Zelllinie auf den Menschen übertragbar sind, werden weitere Untersuchungen mit humanen Zelllinien klären können. Weitläufige Übereinstimmungen zwischen den Forschungsergebnissen aus nicht-humanen und humanen Zelllinien in Hinsicht etwa auf Existenz und Funktionalität des NMDA-Rezeptors sprechen dafür.

Zu den Untereinheiten

Untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit das Expressionsverhalten für die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Wie bereits ausgeführt, handelt es sich dabei um eine für die Funktion des Rezeptors essentielle Komponente (177;178). Aufgrund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass eine veränderte Expression von NMDA-Rezeptorkomplexen einen Niederschlag in vermehrtem oder reduziertem Auftreten von NR1-Untereinheiten findet. Darüber hinaus ist jedoch ebenfalls denkbar, dass es unter den Bedingungen des oxidativen Stresses auch zu einer unterschiedlichen Regulation anderer Untereinheiten kommt, die zum Aufbau des NMDA-Rezeptors beitragen. Es ist bekannt, dass Rezeptorkinetik und -interaktion mit diversen Agonisten und Hemmstoffen wesentlich durch die Zusammensetzung des Rezeptors aus weiteren NR2A-D sowie NR3A-B Einheiten beeinflusst werden (81;179). Möglicherweise moduliert so oxidativer Stress das Ansprechverhalten des Endothels nicht nur durch Heraufregulation von NMDA-Rezeptormolekülen, sondern auch durch Änderung der Rezeptorkomposition. Eine unterschiedliche Regulation der Untereinheiten ist z.B. aus dem mit ROS assoziierten Hypoxiemodell der Retina bekannt (148). Weitergehende Untersuchungen, die das Expressionsverhalten der anderen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors zum Gegenstand haben, könnten hier ein noch differenzierteres Bild der Endothelantwort auf oxidativen Stress liefern.

Diskussion

Zu ROS und ROS-Konzentrationen

Um die Zellen gegenüber oxidativem Stress in Form von O_2^- und $ONOO^-$ zu exponieren, wurde in unseren Versuchen eine Xanthin/Xanthin-Oxidase-Reaktion verwendet. Dieses Generatorsystem ist in der Lage, bei ausreichender Enzymsättigung konstante Mengen an O_2^- zu produzieren (180). Es ist jedoch bekannt, dass als Nebenprodukt dieser Reaktion auch gewisse Mengen an H_2O_2 entstehen. Von dem vorhandenen H_2O_2 , unabhängig davon ob konzentriert zugesetzt oder als Nebenprodukt entstanden, zerfällt wiederum ein Teil über eine nicht-enzymatische Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen (181;182). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache sind daher die Ergebnisse unserer Untersuchungen zu werten, die möglicherweise also jeweils ein Mischbild der Wirkung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies mit Schwerpunkt auf der primär generierten Spezies darstellen.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten ROS-Konzentrationen keine direkten zelltoxischen Wirkungen entfalten, die die Interpretation der Ergebnisse verfälschen würde, wurden von unserer Arbeitsgruppe Zytotoxizitätsassays durchgeführt und die Zellviabilität der b.End3 in Konzentrationsreihen und Kombinationen der verschiedenen ROS erfasst (160). In der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Konzentrationen verwendet, unter denen es dabei zu keinem signifikanten Zelluntergang kam.

Zu Glutamat

Schwerpunkt unserer Untersuchung waren die Wirkungen von ROS auf den NMDA-Rezeptor. Dieser scheint gegenüber anderen Glutamatrezeptoren vorrangig verantwortlich für die Kompromittierung der BHS durch Glutamateinwirkung zu sein; Berichte über eine Rolle metabotroper Rezeptoren in der Störung der BHS (130) konnten an humanen Endothelzelllinien unter Verwendung des spezifischen Agonisten tACPD nicht nachvollzogen werden (86). In letzteren Untersuchungen zeigten sich Glutamat und der spezifische Agonist NMDA bei der verwendeten Konzentration von 1 mM als vergleichbar potent in ihrer Wirkung auf den Abfall der TEER im BHS-Modell. Toxizitätsstudien an bEnd3-Kulturen zeigen, dass erst bei Glutamatkonzentrationen von 30 mM ein signifikanter Zelluntergang nachzuweisen ist. Bei Konzentrationen von 10 mM war in dieser Untersuchung auch nach 24 Stunden keine Einschränkung der Viabilität nachzuweisen (88). Es ist daher anzunehmen,

Diskussion

dass den bei unseren Experimenten beobachteten Effekten von NMDA-Konzentrationen zwischen 0,1 und 2,5 mM vorrangig keine primär zelltoxischen Phänomene zu Grunde liegen. Belegt scheint, dass exogene Gaben von hohen Glutamat-Konzentrationen nervenzelltoxische Wirkungen entfalten und diese über den postulierten Mechanismus der Exzitotoxizität propagiert werden. Strittig ist in der Literatur jedoch, ob die gemeinhin als „exzitotoxisch“ angesehenen Konzentrationen für Glutamat *in vivo* überhaupt erreicht werden. Mittels des Verfahrens der Mikrodialyse konnte in akuten Modellen der Exzitotoxizität wie dem ischämischen Schlaganfall oder Hirntrauma ein bis zu 55facher Anstieg der Glutamatspiegel im Hirninterstitium gemessen werden (90). Durch die begleitende ATP-Depletion und Störung der Glutamat-Transporter von Glia und neuronalen Fortsätzen kann dabei interstitielles Glutamat Konzentrationen bis zu 1 mM erreichen (89). Dabei handelt es sich jedoch bisher stets um Daten aus tierexperimentellen Studien; eine Messung am Menschen verbietet sich aus ethischen Gesichtspunkten und Mangel an Praktikabilität.

Weniger gut belegt ist der Anstieg von Glutamat für chronische neurodegenerative Prozesse. In vielen dieser Krankheitsbilder beobachtet man Störungen der für die Glutamat-Clearance zuständigen Transporter (EAAT), die möglicherweise mit der Pathogenese der Erkrankungen oder ihrer Exazerbation in Verbindung stehen. Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob es sich dabei um Veränderungen mit direktem ätiologischem Bezug handelt oder ob die Glutamat-Dysfunktion erst im Verlauf des Krankheitsgeschehens hinzutritt. Zu den neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen man bereits eine solche Störung des glutamatergen Systems nachweisen konnte, zählen unter anderem die Amyotrophe Lateral Sklerose (ALS), Chorea Huntington, Morbus Parkinson und die Alzheimer'sche Demenz (183). Da viele dieser Erkrankungen zugleich mit Störungen des zellulären Energiestoffwechsels einhergehen und dies zu der exzitotoxischen Wirkung des Glutamats beizutragen scheint (184;185), könnten auch geringer ausgeprägte, chronische Erhöhungen der Glutamatkonzentrationen zu einer Schädigung führen.

Interessant für die vorliegende Fragestellung der Interaktion von oxidativem Stress und Glutamat-System scheint auch die Beobachtung, dass Glutamat-Transporter redox-sensitive Anteile aufweisen, die sie empfindlich für die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies machen. Es wird daher angenommen, dass oxidativer Stress im Rahmen akuter und chronischer neurodegenerativer Erkrankungen zur Inaktivierung von Glutamat-Transportern und somit zu einer parallelen Aktivierung exzitotoxischer Prozesse führen könnte (186;187). Unter diesen Bedingungen von oxidativem und exzitotoxischem Stress könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hochregulation von NMDA-Rezeptoren ihre Wirkung entfalten.

Diskussion

5.6. Ausblick

Die experimentelle Erforschung exzitotoxischer Phänomene und die vielversprechende Entwicklung selektiver NMDA-Rezeptorantagonisten wie MK-801 weckten in den vergangenen Jahren Hoffnungen auf ein großes klinisches Potential der Glutamatrezeptor-Antagonisierung. Vor allem im Modell des ischämischen Schlaganfalls und des Hirntraumas, welche in tierexperimentellen Untersuchungen zahlreiche vielversprechende Ergebnisse geliefert hatten, führten ausbleibende Erfolge und gravierende Nebenwirkungen der eingesetzten Antagonisten auf das ZNS jedoch dazu, dass nach und nach alle Studien abgebrochen wurden (188-191).

Im Jahr 2001 schließlich schienen daher sämtliche Studien zum Einsatz von NMDA-Antagonisten fehlgeschlagen. Einige Autoren verwiesen auf systematische Fehler in der Herangehensweise an exzitotoxische Schädigung. Eine Antagonisierung von Glutamatrezeptoren könne zwar kurzfristig Überstimulation verhindern, führe aber mittel- und langfristig zur Blockierung der physiologischen Rolle von Glutamat, das einen wichtigen Stimulus für das neuronale Überleben und für die auf die Schädigung folgende Neurogenese und Differenzierung darstellt (192;193). Lee *et al.* zeigten, dass Blockierung sämtlicher exzitatorischer Aktivität zur Apoptose führt (194). Andere argumentierten mit Fehlern in der Konzeption der Studien, zu geringen therapeutischen Zeitfenstern, Unterschieden zwischen Tier- und Humanphysiologie, bei bestehenden teils schweren Nebenwirkungen nur niedrigen erreichbaren Konzentrationen der Antagonisten sowie mangelnder Sensitivität der klinischen Evaluation (158;193)

Lediglich Memantin, ein kompetitiver Antagonist mit kurzen Bindungszeiten, der am NMDA-Rezeptors vornehmlich eine Überstimulation zu verhindern scheint, zeigte in klinischen Studien zur Behandlung der Alzheimer Demenz positive Effekte auf Kognition und Psychomotorik bei günstigem Nebenwirkungsprofil (195).

Vor dem Hintergrund dieser Rückschläge auf dem Gebiet der Neuroprotektion durch NMDA-Antagonisten zeichnet sich ein zunehmend differenzierteres Bild der beteiligten Prozesse ab, so dass eine „magic bullet“, d.h. eine auf ein einzelnes pathogenetisches Prinzip gemünzte erfolgreiche Therapiestrategie immer unwahrscheinlicher wird. Vielmehr werden verstärkt multimodale Therapieansätze gefordert, die entzündlichen, exzitotoxischen, oxidativen und apoptotischen Prozessen in Pathogenese und Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen Rechnung tragen und so ein „Verlagern“ des Zelluntergangs auf die jeweils anderen

Diskussion

Vorgänge unter Therapie verhindern sollen (196). So erwies sich etwa eine Kombination von Antiinflammation und NMDA-Antagonisierung bei experimenteller fokaler Ischämie als effektiver gegenüber einer Monotherapie der jeweiligen Substanzen (197).

In dieses komplexe Bild fügt sich auch die Erhaltung der BHS-Integrität als wichtiges Therapieziel ein. Ein möglicher Ansatz könnte zukünftig die Entwicklung extrasynaptischer oder vasoselektiver Glutamatrezeptor-Antagonisten sein. Solche Substanzen würden gezielt an den NMDA-Rezeptoren des BHS-Endothels angreifen, dabei jedoch nur geringe Nebenwirkungen durch Störung der neuronalen Aktivität und des „neuronal survival“ entfalten. Auch die Entwicklung noch selektiverer Antagonisten, die spezifische Untereinheiten bzw. deren Kombinationen blockieren, oder solcher mit besonderer Kinetik, wie das Beispiel Memantin zeigt, könnte zur besseren Tolerabilität dieser Substanzgruppe beitragen und höhere, therapeutisch wirksamere Dosierungen ermöglichen. Problematisch erscheint für die Behandlung akuter Neuropathologien wie Schlaganfall und Trauma weiterhin das therapeutisch wirksame Zeitfenster für Neuroprotektion und Schutz der BHS, das in der Praxis meist nicht reproduziert werden kann. Hier könnte die Kombination mit klinisch bereits erfolgreich verwandten Hypothermieverfahren (198;199) dazu beitragen, die Zeitspanne bis zum Einsetzen einer therapeutischen Wirkung geeigneter NMDA-Antagonisten zu überbrücken.

Die vorliegenden Experimente zeigen auf, dass zum Schutz der BHS, in Analogie zum Konzept der multimodalen Neuroprotektion, eine Kombination aus anti-exzitotoxischen und anti-oxidativen Strategien vielversprechend sein könnte. Eine gezielte Blockierung der hier beobachteten synergistischen Wirkungen von oxidativem Stress und NMDA-Rezeptoraktivität könnte so möglicherweise zu einer effektiveren Behandlung des Schrankenversagens in diversen Neuropathologien beitragen. Neben dem Einsatz reiner Radikalfänger könnte jedoch auch die weitere Ergründung down-stream gelegener Signalwege zur NMDA-Rezeptorregulation neue therapeutische Angriffspunkte offenbaren.

6. Zusammenfassung

Oxidativer Stress in Form reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Exzitotoxizität durch supraphysiologische Konzentrationen des Neurotransmitters Glutamat sind nicht nur beteiligt an der Pathogenese vielzähliger neurodegenerativer Erkrankungen wie Schlaganfall, Hirntrauma, Alzheimer Demenz oder Multipler Sklerose, sondern spielen zudem eine Schlüsselrolle im dort beobachteten Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke. Glutamat führt durch Stimulation neuronaler und endothelialer NMDA-Rezeptoren zu einer Generierung von ROS. Nicht verfolgt worden war bisher, welche Auswirkungen ROS umgekehrt auch auf den NMDA-Rezeptor haben könnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob und in welcher Weise die Exposition gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies einen Einfluss auf die Expression und Aktivierbarkeit von NMDA-Rezeptoren auf zerebrovaskulären Endothelzellen ausübt.

Es konnte zunächst die Expression der funktionell obligaten NR-1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors auf der verwendeten Zelllinie b.End3 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie gesichert werden. Ein Nachweis von mRNA für die Untereinheiten NR1 und NR2B, C und D erfolgte mittels RT-PCR. In der Analyse der replizierten RNA zeigten sich Hinweise für eine heterogene Komposition der exprimierten endothelialen NMDA-Rezeptoren.

Es konnte weiter mit Hilfe der In-Cell-Western-Technik gezeigt werden, dass die Expression des NMDA-Rezeptors durch transiente Stimulation mit reaktiven Sauerstoffspezies im Sinne einer Heraufregulation moduliert werden kann. Die Stimulation der Zellen mit den reaktiven Sauerstoffspezies O_2^- , $ONOO^-$ und H_2O_2 führte dabei im Experiment zu einer deutlichen Zunahme der NR1-Expression, die spätestens nach 72 Stunden höchst signifikant war.

Um zu überprüfen, welche Bedeutung diese Überexpression für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke unter den exzitotoxischen Bedingungen hoher Glutamatkonzentrationen haben könnte, wurde mit Hilfe des ECIS-Systems („Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing“) die Impedanz ROS-präexponierter Endothelmonolayer gemessen. Auf Rezeptorstimulation mit dem spezifischen Agonisten NMDA reagierten die vorbehandelten Gruppen mit einem Abfall der Impedanz gegenüber der nicht vorbehandelten Kontrolle.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ROS in der Lage sind, funktionelle endotheliale NMDA-Rezeptoren zu induzieren und auf diesem Weg zu einem verstärkten Abfall der BHS-Integrität unter den Bedingungen exzitotoxischen und oxidativen Stresses führen. Dies stellt einen neuen Mechanismus zur Erklärung der Pathogenese des Blut-Hirn-Schrankenversagens dar.

7. Abstract

Oxidative stress in the form of reactive oxygen species (ROS) and excitotoxicity caused by excessive concentrations of the neurotransmitter glutamate not only participate in the pathogenesis of diverse neurodegenerative diseases like stroke, brain trauma, Alzheimer dementia or multiple sclerosis but do also play a key role in the disruption of the blood-brain barrier observed in these pathologies. Glutamate leads to generation of ROS via stimulation of neuronal and endothelial NMDA receptors. As yet, no investigations have been conducted examining whether ROS might have influences on the NMDA receptor as well. The present study was therefore performed to establish if and in what manner exposition to ROS modulates the expression and activity of NMDA receptors on cerebrovascular endothelium. Firstly, expression of the NR1 subunit mandatory for functionality of NMDA the receptor was confirmed on the b.End3 cell line employed in the experiments with immunofluorescence microscopy. RT-PCR was performed to detect mRNA for the subunits NR1 as well as NR2B, C and D. Analysis of replicated RNA suggested a heterogeneous composition of expressed endothelial NMDA receptors.

Using the In-Cell Western technique, it was shown that transient stimulation of cells with ROS modulates NMDA receptor expression, resulting in an up-regulation of receptors. Stimulation with the reactive oxygen species O_2^- , $ONOO^-$ and H_2O_2 led to marked increase in NR1 expression, which was highly significant ($p < 0.001$) after 72 hours.

To evaluate the impact of overexpression of NMDA receptors on the integrity of the blood-brain barrier, the ECIS system („Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing“) was used to measure the impedance of an ROS pre-exposed monolayer. Pre-treated groups reacted to stimulation using the specific agonist NMDA with a decrease in impedance as opposed to non pre-treated controls.

The results presented in this study support the hypothesis that ROS induce functional endothelial NMDA receptors and thus further disruption of blood-brain barrier integrity under conditions of excitotoxic and oxidative stress. Upregulation of NMDA receptors through the action of oxidative stress represents a novel mechanism in the pathogenesis of blood-brain barrier dysfunction.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews* 1999; 51.
- (2) Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of Neurovirology* 1999; 5(6):556-569.
- (3) Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview - Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* 2004; 16(1):1-13.
- (4) Vorbrodt AW. Morphological evidence of the functional polarization of brain microvascular endothelium. in: Pardridge, W M (1993) *The Blood-brain Barrier Cellular and Molecular Biology*, Raven, New York, 137-164 1991;(1991).
- (5) Paulson OB, Newman EA. Does the Release of Potassium from Astrocyte Endfeet Regulate Cerebral Blood-Flow. *Science* 1987; 237(4817):896-898.
- (6) Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb Journal* 2002; 16(8):1274-+.
- (7) Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 1998; 53(6):637-644.
- (8) Gardner TW, Lieth E, Khin SA, Barber AJ, Bonsall DJ, Leshner T et al. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1997; 38(11):2423-2427.
- (9) Grant GA, Abbott NJ, Janigro D. Understanding the physiology of the blood-brain barrier: In vitro models. *News in Physiological Sciences* 1998; 13:287-293.
- (10) Rash JE, Nagy JI, Yasumura T. Freeze-fracture immunogold labeling and histological mapping of connexins Cx43, Cx30, and Cx32 in gap junctions of ependymocytes, astrocytes, and oligodendrocytes in rat brain and spinal cord. *Molecular Biology of the Cell* 1998; 9:95A.
- (11) Mi HY, Haeberle H, Barres BA. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *Journal of Neuroscience* 2001; 21(5):1538-1547.
- (12) Yoder EJ. Modifications in astrocyte morphology and calcium signaling induced by a brain capillary endothelial cell line. *Glia* 2002; 38(2):137-145.
- (13) Holash JA, Noden DM, Stewart PA. Reevaluating the Role of Astrocytes in Blood-Brain-Barrier Induction. *Developmental Dynamics* 1993; 197(1):14-25.
- (14) Krum JM. Experimental Gliopathy in the Adult-Rat Cns - Effect on the Blood-Spinal Cord Barrier. *Glia* 1994; 11(4):354-366.

Literaturverzeichnis

- (15) Stewart PA, Hayakawa K. Early Ultrastructural-Changes in Blood-Brain-Barrier Vessels of the Rat Embryo. *Developmental Brain Research* 1994; 78(1):25-34.
- (16) Jacobson M. *Developmental Neurobiology*. 1991.
- (17) Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2000; 20(2):131-147.
- (18) Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2001; 280(4):C719-C741.
- (19) Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory Amino-Acid Neurotoxicity and Neurodegenerative Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 1990; 11(9):379-387.
- (20) Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer, E.G., Olney, J.W., McGeer, P.L. (1978) *Kainic acid as a tool in neurobiology*. Raven Press, New York, 95-121. 1978.
- (21) Hazell AS. Excitotoxic mechanisms in stroke: An update of concepts and treatment strategies. *Neurochemistry International* 2007; 50(7-8):941-953.
- (22) Clark GD. Role of excitatory amino acids in brain injury caused by hypoxia-ischemia, status epilepticus, and hypoglycemia. *Clin Perinatol* 1989; 16(2):459-474.
- (23) Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001; 49(6):735-741.
- (24) Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(6):657-668.
- (25) Suh SW, Hamby AM, Swanson RA. Hypoglycemia, brain energetics, and hypoglycemic neuronal death. *Glia* 2007; 55(12):1280-1286.
- (26) Isaev NK, Stel'mashuk EV, Zorov DB. Cellular mechanisms of brain hypoglycemia. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72(5):471-478.
- (27) Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol* 2005; 15(3):234-240.
- (28) Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma* 2000; 17(10):857-869.
- (29) Noe KH, Manno EM. Mechanisms underlying status epilepticus. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41(4):257-266.
- (30) Estrada Sanchez AM, Mejia-Toiber J, Massieu L. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res* 2008; 39(3):265-276.

Literaturverzeichnis

- (31) Fan MM, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007; 81(5-6):272-293.
- (32) Davies S, Ramsden DB. Huntington's disease. *Mol Pathol* 2001; 54(6):409-413.
- (33) Mattson MP, Haughey NJ, Nath A. Cell death in HIV dementia. *Cell Death Differ* 2005; 12 Suppl 1:893-904.
- (34) Mukhtar M, Acheampong E, Parveen Z, Pomerantz RJ. T-Cells and excitotoxicity: HIV-1 and other neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2005; 7(3):265-273.
- (35) Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 1998; 44(3 Suppl 1):S110-S114.
- (36) Loopuijt LD, Schmidt WJ. The role of NMDA receptors in the slow neuronal degeneration of Parkinson's disease. *Amino Acids* 1998; 14(1-3):17-23.
- (37) Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids* 1998; 14(1-3):69-74.
- (38) Greenamyre JT. Glutamatergic influences on the basal ganglia. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24(2):65-70.
- (39) Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2(5):657-662.
- (40) Chohan MO, Iqbal K. From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 10(1):81-87.
- (41) Doraiswamy PM. Alzheimer's disease and the glutamate NMDA receptor. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37(2):41-49.
- (42) Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2004; 45(5):583-595.
- (43) Wenk GL, Parsons CG, Danysz W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav Pharmacol* 2006; 17(5-6):411-424.
- (44) Corona JC, Romo LB, Tapia R. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(11):1415-1428.
- (45) Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den BL. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2005; 2(3-4):147-159.
- (46) Kawahara Y, Kwak S. Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2005; 6(3):131-144.

Literaturverzeichnis

- (47) Rao SD, Weiss JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* 2004; 27(1):17-23.
- (48) Heath PR, Shaw PJ. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002; 26(4):438-458.
- (49) Matute C, Alberdi E, Domercq M, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Sanchez-Gomez MV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 2001; 24(4):224-230.
- (50) Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Perez-Samartin A, Rodriguez-Antiguedad A et al. Excitotoxic damage to white matter. *J Anat* 2007; 210(6):693-702.
- (51) Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 2006; 53(2):212-224.
- (52) Sontheimer H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem* 2008; 105(2):287-295.
- (53) Seki M, Lipton SA. Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. *Prog Brain Res* 2008; 173:495-510.
- (54) Naskar R, Dreyer EB. New horizons in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2001; 45 Suppl 3:S250-S255.
- (55) Hartwick AT. Beyond intraocular pressure: neuroprotective strategies for future glaucoma therapy. *Optom Vis Sci* 2001; 78(2):85-94.
- (56) Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 1999; 43 Suppl 1:S142-S150.
- (57) Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997; 4(5):270-273.
- (58) Dreyer EB. A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma* 1998; 7(1):62-67.
- (59) Fonnum F. Glutamate - A Neurotransmitter in Mammalian Brain. *Journal of Neurochemistry* 1984; 42(1):1-11.
- (60) Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 1999; 81(3):163-221.
- (61) Constantine-Paton M. Nmda Receptor As A Mediator of Activity-Dependent Synaptogenesis in the Developing Brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1990; 55:431-443.

Literaturverzeichnis

- (62) Lipton SA, Kater SB. Neurotransmitter Regulation of Neuronal Outgrowth, Plasticity and Survival. *Trends in Neurosciences* 1989; 12(7):265-270.
- (63) Gasic GP, Hollmann M. Molecular Neurobiology of Glutamate Receptors. *Annual Review of Physiology* 1992; 54:507-536.
- (64) Smith QR. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *Journal of Nutrition* 2000; 130(4):1016S-1022S.
- (65) Pitkanen HT, Oja SS, Kemppainen K, Seppa JM, Mero AA. Serum amino acid concentrations in aging men and women. *Amino Acids* 2003; 24(4):413-421.
- (66) Erecinska M, Silver IA. Metabolism and Role of Glutamate in Mammalian Brain. *Progress in Neurobiology* 1990; 35(4):245-296.
- (67) Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory Amino-Acids As A Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *New England Journal of Medicine* 1994; 330(9):613-622.
- (68) Kanai Y, Hediger MA. Primary Structure and Functional-Characterization of A High-Affinity Glutamate Transporter. *Nature* 1992; 360(6403):467-471.
- (69) Dubinsky JM, Rothman SM. Intracellular Calcium Concentrations During Chemical Hypoxia and Excitotoxic Neuronal Injury. *Journal of Neuroscience* 1991; 11(8):2545-2551.
- (70) Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W. Do Defects in Mitochondrial Energy-Metabolism Underlie the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences* 1993; 16(4):125-131.
- (71) Bliss TVP, Collingridge GL. A Synaptic Model of Memory - Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Nature* 1993; 361(6407):31-39.
- (72) Monyer H, Giffard RG, Hartley DM, Dugan LL, Goldberg MP, Choi DW. Oxygen Or Glucose Deprivation-Induced Neuronal Injury in Cortical Cell-Cultures Is Reduced by Tetanus Toxin. *Neuron* 1992; 8(5):967-973.
- (73) Rothman SM, Thurston JH, Hauhart RE. Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro. *Neuroscience* 1987; 22(2):471-480.
- (74) Ferrarese C, Pecora N, Frigo M, Appollonio I, Frattola L. Assessment of Reliability and Biological Significance of Glutamate Levels in Cerebrospinal-Fluid. *Annals of Neurology* 1993; 33(3):316-319.
- (75) Stark H, Sven Graßmann, Ulrich Reichert. Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren Teil 2: Therapiekonzepte und neue Rezeptorliganden. *Pharmazie in unserer Zeit* 2000; 29(4):228-236.
- (76) Black MD. Therapeutic potential of positive AMPA modulators and their relationship to AMPA receptor subunits. A review of preclinical data. *Psychopharmacology* 2005; 179(1):154-163.

Literaturverzeichnis

- (77) Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17:31-108.
- (78) Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 1998; 396(6710):433-439.
- (79) Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11(7):290-296.
- (80) Collingridge GL. The induction of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358(1432):635-641.
- (81) Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 2001; 11(3):327-335.
- (82) Skerry TM, Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001; 22(4):174-181.
- (83) Krizbai IA, Deli MA, Pestenecz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I et al. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *Journal of Neuroscience Research* 1998; 54(6):814-819.
- (84) Morley P, Small DL, Murray CL, Mealing GA, Poulter MO, Durkin JP et al. Evidence that functional glutamate receptors are not expressed on rat or human cerebrovascular endothelial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1998; 18(4):396-406.
- (85) Preston E, Webster J, Palmer GC. Lack of evidence for direct involvement of NMDA receptors or polyamines in blood-brain barrier injury after cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 1998; 813(1):191-194.
- (86) Sharp CD, Hines I, Houghton J, Warren A, Jackson TH, Jawahar A et al. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2003; 285(6):H2592-H2598.
- (87) Parfenova H, Fedinec A, Leffler CW. Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003; 23(2):190-197.
- (88) Scott GS, Bowman SR, Smith T, Flower RJ, Bolton C. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochemical Pharmacology* 2007; 73(2):228-236.
- (89) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral-Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 1984; 43(5):1369-1374.

Literaturverzeichnis

- (90) Bogaert L, Scheller D, Moonen J, Sarre S, Smolders I, Ebinger G et al. Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia. *Brain Research* 2000; 887(2):266-275.
- (91) Ozyurt E, Graham DI, Woodruff GN, McCulloch J. Protective Effect of the Glutamate Antagonist, Mk-801 in Focal Cerebral-Ischemia in the Cat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1988; 8(1):138-143.
- (92) Dietrich WD, Alonso O, Halley M, Busto R, Globus MYT. Intraventricular Infusion of N-Methyl-D-Aspartate .1. Acute Blood-Brain-Barrier Consequences. *Acta Neuropathologica* 1992; 84(6):621-629.
- (93) Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, Lu CY. Capillary Nmda Receptors Regulate Blood-Brain-Barrier Function and Breakdown. *Brain Research* 1992; 588(2):297-303.
- (94) Westergren I, Johansson BB. Nbxq, An Ampa Antagonist, Reduces Glutamate-Mediated Brain Edema. *Brain Research* 1992; 573(2):324-326.
- (95) Westergren I, Johansson BB. Blockade of Ampa Receptors Reduces Brain Edema Following Opening of the Blood-Brain-Barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1993; 13(4):603-608.
- (96) Sharp CD, Houghton J, Elrod JW, Warren A, Jackson TH, Jawahar A et al. N-methyl-D-aspartate receptor activation in human cerebral endothelium promotes intracellular oxidant stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2005; 288(4):H1893-H1899.
- (97) McQuaid KE, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: Roles for nitric oxide? *Experimental Physiology* 1997; 82(2):369-376.
- (98) Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival - A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circulation Research* 2000; 87(3):179-183.
- (99) Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10(2):248-253.
- (100) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases - The role of oxidant stress. *Circulation Research* 2000; 87(10):840-844.
- (101) Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. Vascular oxidant stress: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2000; 56(1):57-64.
- (102) Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10(23):2495-2505.
- (103) Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiological Reviews* 1979; 59(3):527-605.

Literaturverzeichnis

- (104) Lenaz G, Bovina C, D'aurelio M, Fato R, Formigini G, Genova ML et al. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process 2002; 959:199-213.
- (105) Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Bioscience Reports 1997; 17(1):3-8.
- (106) St Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. Journal of Biological Chemistry 2002; 277(47):44784-44790.
- (107) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial Injury from Nitric-Oxide and Superoxide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1990; 87(4):1620-1624.
- (108) Brookes PS, Yoon YS, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. American Journal of Physiology-Cell Physiology 2004; 287(4):C817-C833.
- (109) Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. Faseb Journal 1997; 11(2):118-124.
- (110) Halliwell B, Gutteridge JMC. The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological-Systems. Free Radical Biology and Medicine 1995; 18(1):125-126.
- (111) Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric oxide and multiple sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep 2005; 5(3):232-238.
- (112) Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. Lancet Neurology 2002; 1(4):232-241.
- (113) Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. American Journal of Cardiology 2003; 91(3):7A-11A.
- (114) Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia - The 2001 Willis Lecture. Stroke 2001; 32(11):2712-2716.
- (115) Kontos HA. Oxygen Radicals in Cerebral Vascular Injury. Circulation Research 1985; 57(4):508-516.
- (116) Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, Mcever RP, McIntyre TM. Oxygen Radicals Induce Human Endothelial-Cells to Express Gmp-140 and Bind Neutrophils. Journal of Cell Biology 1991; 112(4):749-759.
- (117) Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen Peroxide-Induced Increase in Endothelial Adhesiveness Is Dependent on Icam-1 Activation. American Journal of Physiology 1993; 264(4):L406-L412.

Literaturverzeichnis

- (118) Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research* 1997; 80(3):383-392.
- (119) Johnson A, Phillips P, Hocking D, Tsan MF, Ferro T. Protein-Kinase Inhibitor Prevents Pulmonary-Edema in Response to H₂O₂. *American Journal of Physiology* 1989; 256(4):H1012-H1022.
- (120) Kevil CG, Ohno N, Gute DC, Okayama N, Robinson SA, Chaney E et al. Role of cadherin internalization in hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 24(6):1015-1022.
- (121) Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS. H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2000; 279(1):C21-C30.
- (122) SiflingerBirnboim A, Lum H, DelVecchio PJ, Malik AB. Involvement of Ca²⁺ in the H₂O₂-induced increase in endothelial permeability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1996; 14(6):L973-L978.
- (123) Volk T, Hensel M, Kox WJ. Transient Ca²⁺ changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: Role of hydrogen peroxide. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997; 171(1-2):11-21.
- (124) Dreher D, Junod AF. Differential-Effects of Superoxide, Hydrogen-Peroxide, and Hydroxyl Radical on Intracellular Calcium in Human Endothelial-Cells. *Journal of Cellular Physiology* 1995; 162(1):147-153.
- (125) Lopez-Ongil S, Torrecillas G, Perez-Sala D, Gonzalez-Santiago L, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. Mechanisms involved in the contraction of endothelial cells by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 26(5-6):501-510.
- (126) Shasby DM, Lind SE, Shasby SS, Goldsmith JC, Hunninghake GW. Reversible Oxidant-Induced Increases in Albumin Transfer Across Cultured Endothelium - Alterations in Cell-Shape and Calcium Homeostasis. *Blood* 1985; 65(3):605-614.
- (127) Hinshaw DB, Burger JM, Armstrong BC, Hyslop PA. Mechanism of Endothelial-Cell Shape Change in Oxidant Injury. *Journal of Surgical Research* 1989; 46(4):339-349.
- (128) Paarmann I, Frermann D, Keller BU, Hollmann M. Expression of 15 glutamate receptor subunits and various splice variants in tissue slices and single neurons of brainstem nuclei and potential functional implications. *Journal of Neurochemistry* 2000; 74(4):1335-1345.
- (129) Beart PM, Sheehan KAM, Manallack DT. Absence of N-Methyl-D-Aspartate Receptors on Ovine Cerebral Microvessels. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1988; 8(6):879-882.
- (130) Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL et al. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(17):14801-14811.

Literaturverzeichnis

- (131) St'astny F, Schwendt M, Lisy V, Jezova D. Main subunits of ionotropic glutamate receptors are expressed in isolated rat brain microvessels. *Neurological Research* 2002; 24(1):93-96.
- (132) Minagar A, Steven AJ, Kelley RE, Harper M, Jennings MH. Proteomic Analysis of Human Cerebral Endothelial Cells Activated by Glutamate/MK-801: Significance in Ischemic Stroke Injury. *J Mol Neurosci* 2008.
- (133) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A et al. Mutations in Cu/Zn Superoxide-Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic-Lateral-Sclerosis. *Nature* 1993; 362(6415):59-62.
- (134) Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders. *Science* 1993; 262(5134):689-695.
- (135) Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 39(1):51-70.
- (136) Pun PBL, Lu J, Moochhala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radical Research* 2009.
- (137) Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000; 57(8-9):1287-1305.
- (138) Heusler P, Boehmer G. The superoxide anion is involved in the induction of long-term potentiation in the rat somatosensory cortex in vitro. *Brain Research* 2004; 1024(1-2):104-112.
- (139) Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung KS. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 2007; 131(3):262-271.
- (140) PALL ML. NMDA sensitization and stimulation by peroxynitrite, nitric oxide, and organic solvents as the mechanism of chemical sensitivity in multiple chemical sensitivity. *FASEB J* 2002; 16(11):1407-1417.
- (141) Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Park JW, Itano T, Nagao S et al. Intracerebral hemorrhage induces edema and oxidative stress and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunits expression. *Acta Neurochir Suppl* 2005; 95:421-424.
- (142) Won MH, Kang TC, Park SK, Jeon GS, Kim YW, Seo JH et al. The alterations of N-Methyl-D-aspartate receptor expressions and oxidative DNA damage in the CA1 area at the early time after ischemia-reperfusion insult. *Neuroscience Letters* 2001; 301(2):139-142.
- (143) Klann E, Thiels E. Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: Implications for hippocampal synaptic plasticity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 1999; 23(3):359-376.

Literaturverzeichnis

- (144) Knapp LT, Klann E. Potentiation of hippocampal synaptic transmission by superoxide requires the oxidative activation of protein kinase C. *Journal of Neuroscience* 2002; 22(3):674-683.
- (145) Klann E, Roberson ED, Knapp LT, Sweatt JD. A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(8):4516-4522.
- (146) Knapp LT, Klann E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: Contributory or inhibitory? *Journal of Neuroscience Research* 2002; 70(1):1-7.
- (147) MacDonald JF, Kotecha SA, Lu WY, Jackson MF. Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. *Current Drug Targets* 2001; 2(3):299-312.
- (148) Crosson LA, Kroes RA, Moskal JR, Linsenmeier RA. Gene expression patterns in hypoxic and post-hypoxic adult rat retina with special reference to the NMDA receptor and its interactome. *Mol Vis* 2009; 15:296-311.
- (149) Lagowska-Lenard M, Bielewicz J, Raszewski G, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H. [Oxidative stress in cerebral stroke]. *Pol Merkur Lekarski* 2008; 25(147):205-208.
- (150) Paternotte E, Gaucher C, Labrudeb P, Stoltz JF, Menu P. Review: Behaviour of endothelial cells faced with hypoxia. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2008; 18(4-5):295-299.
- (151) Vazhappilly R, Sucher NJ. Translational regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1. *Neurosignals* 2004; 13(4):190-193.
- (152) Moor ACE, Devries HE, Deboer AG, Breimer DD. The Blood-Brain-Barrier and Multiple-Sclerosis. *Biochemical Pharmacology* 1994; 47(10):1717-1724.
- (153) Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *Faseb Journal* 2000; 14(5):691-698.
- (154) Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, Scott GS, Hooper DC. The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *Journal of Immunology* 2000; 165(11):6511-6518.
- (155) Bowman GL, Kaye JA, Moore M, Waichunas D, Carlson NE, Quinn JF. Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease - Stability and functional significance. *Neurology* 2007; 68(21):1809-1814.
- (156) Paul C, Bolton C. Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302(1):50-57.

Literaturverzeichnis

- (157) Gorgulu A, Kins T, Cobanoglu S, Unal F, Izgi N, Yanik B et al. Reduction of edema and infarction by memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochirurgica* 2000; 142(11):1287-1292.
- (158) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 1999; 22(9):391-397.
- (159) Kuhlmann CRW, Zehendner CM, Gerigk M, Closhen D, Bender B, Friedl P et al. MK801 blocks hypoxic blood-brain-barrier disruption and leukocyte adhesion. *Neuroscience Letters* 2009; 449(3):168-172.
- (160) Betzen C, White R, Zehendner CM, Pietrowski E, Bender B, Luhmann HJ et al. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radical Biology and Medicine* 2009; 47:1212-1220.
- (161) Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE. Nmda Receptor Activation Produces Concurrent Generation of Nitric-Oxide and Reactive Oxygen Species - Implication for Cell-Death. *Journal of Neurochemistry* 1995; 65(5):2016-2021.
- (162) Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF et al. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2006; 290(5):C1399-C1410.
- (163) Kuhlmann CR, Gerigk M, Bender B, Closhen D, Lessmann V, Luhmann HJ. Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci* 2008; 82(25-26):1281-1287.
- (164) Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A, van Doorn R, Gringhuis SI, van der Pol S et al. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *Faseb Journal* 2007; 21(13):3666-3676.
- (165) Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *Journal of Neurochemistry* 2007; 101(2):566-576.
- (166) Kuhlmann CRW, Tamaki R, Gamerdinger M, Lessmann V, Behl C, Kempinski OS et al. Inhibition of the myosin light chain kinase prevents hypoxia-induced blood-brain barrier disruption. *Journal of Neurochemistry* 2007; 102(2):501-507.
- (167) Ghigo D, Arese M, Todde R, Vecchi A, Silvagno F, Costamagna C et al. Middle T-Antigen Transformed Endothelial-Cells Exhibit An Increased Activity of Nitric-Oxide Synthase. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 181(1):9-19.
- (168) Song L, Pachter JS. Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2003; 39(7):313-320.
- (169) Williams RL, Risau W, Zerwes HG, Drexler H, Aguzzi A, Wagner EF. Endothelioma Cells Expressing the Polyoma Middle-T Oncogene Induce Hemangiomas by Host-Cell Recruitment. *Cell* 1989; 57(6):1053-1063.

Literaturverzeichnis

- (170) Wagner EF, Risau W. Oncogenes in the Study of Endothelial-Cell Growth and Differentiation. *Seminars in Cancer Biology* 1994; 5(2):137-145.
- (171) Williams RL, Courtneidge SA, Wagner EF. Embryonic Lethalities and Endothelial Tumors in Chimeric Mice Expressing Polyoma-Virus Middle-T Oncogene. *Cell* 1988; 52(1):121-131.
- (172) Bocchietto E, Guglielmetti A, Silvagno F, Taraboletti G, Pescarmona GP, Mantovani A et al. Proliferative and Migratory Responses of Murine Microvascular Endothelial-Cells to Granulocyte-Colony-Stimulating Factor. *Journal of Cellular Physiology* 1993; 155(1):89-95.
- (173) Garlanda C, Parravicini C, Sironi M, Derossi M, Decalmanovici RW, Carozzi F et al. Progressive Growth in Immunodeficient Mice and Host-Cell Recruitment by Mouse Endothelial-Cells Transformed by Polyoma Middle-Sized T-Antigen - Implications for the Pathogenesis of Opportunistic Vascular Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91(15):7291-7295.
- (174) Bussolino F, Derossi M, Sica A, Colotta F, Wang JM, Bocchietto E et al. Murine Endothelioma Cell-Lines Transformed by Polyoma Middle T-Oncogene As Target for and Producers of Cytokines. *Journal of Immunology* 1991; 147(7):2122-2129.
- (175) Omid Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton M. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Research* 2003; 990(1-2):95-112.
- (176) Lo CM, Keese CR, Giaever I. Cell-substrate contact: Another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. *Experimental Cell Research* 1999; 250(2):576-580.
- (177) Masu M, Nakanishi S. Structural and Functional-Characterization of Nmda Receptors and Metabotropic Glutamate Receptors. *Journal of Neurochemistry* 1993; 61:S256.
- (178) Mori H, Mishina M. Structure and Function of the Nmda Receptor-Channel. *Neuropharmacology* 1995; 34(10):1219-1237.
- (179) Brimecombe JC, Boeckman FA, Aizenman E. Functional consequences of NR2 subunit composition in single recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94(20):11019-11024.
- (180) Shatos MA, Doherty JM, Orfeo T, Hoak JC, Collen D, Stump DC. Modulation of the Fibrinolytic Response of Cultured Human Vascular Endothelium by Extracellularly Generated Oxygen Radicals. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(1):597-601.
- (181) Mccord JM, FRIDOVIC.I. Superoxide Dismutase An Enzymic Function for Erythrocyuprein (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 1969; 244(22):6049-&.

Literaturverzeichnis

- (182) FRIDOVIC.I. A Study of Interaction of Acetoacetic Decarboxylase with Several Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 1968; 243(5):1043-&.
- (183) Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International* 2007; 51(6-7):333-355.
- (184) Blandini F, Porter RHP, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology* 1996; 12(1):73-94.
- (185) Ikonomidou C, Turski L. Neurodegenerative disorders: clues from glutamate and energy metabolism. *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10(2):239-263.
- (186) Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends in Pharmacological Sciences* 1998; 19(8):328-334.
- (187) Rothstein JD, Jin L, Dykeshoberg M, Kuncl RW. Chronic Inhibition of Glutamate Uptake Produces A Model of Slow Neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(14):6591-6595.
- (188) Ikonomidou C, Stefovaska V, Turski L. Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(23):12885-12890.
- (189) Davis SM, Lees KR, Albers GW, Diener HC, Markabi S, Karlsson G et al. Selfotel in acute ischemic stroke - Possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke* 2000; 31(2):347-354.
- (190) Albers GW, Clark WM, Atkinson RP, Madden K, Data JL, Whitehouse MJ. Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30(3):508-513.
- (191) Morris GF, Bullock R, Marshall SB, Marmarou A, Maas A, Marshall LF. Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *J Neurosurg* 1999; 91(5):737-743.
- (192) Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurology* 2002; 1(6):383-386.
- (193) Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 2004; 4(2):131-136.
- (194) Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999; 399(6738):A7-A14.
- (195) Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. A 24-week open-label extension study of memantine in moderate to severe Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 2006; 63(1):49-54.

Literaturverzeichnis

- (196) Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews* 2002; 39(1):55-73.
- (197) Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Combined neuroprotection and reperfusion therapy for stroke - Effect of lubeluzole and diaspirin cross-linked hemoglobin in experimental focal ischemia. *Stroke* 1996; 27(9):1571-1576.
- (198) Marion D, Bullock MR. Current and future role of therapeutic hypothermia. *J Neurotrauma* 2009; 26(3):455-467.
- (199) Globus MYT, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate Release and Free-Radical Production Following Brain Injury - Effects of Posttraumatic Hypothermia. *Journal of Neurochemistry* 1995; 65(4):1704-1711.

Danksagung

Danksagung

Lebenslauf

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Christian Betzen
Geburtsdatum: 09.09.1985
Geburtsort: Bingen am Rhein
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1992 bis 1995 Grundschole Hargesheim
1995 bis 2004 Alfred-Delp-Schule Hargesheim, Abitur (Note 1,0)

Akademische Ausbildung

10/2004 – 05/2011 Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
Famulaturen in Wittmund, Mainz, Heidelberg und Port Antonio, Jamaika
02/2010 – 01/2011 Praktisches Jahr am Gemeinschaftsklinikum Koblenz-Mayen und am King's College Hospital, London
05/2011 Staatsexamen (Note 1,3)

Forschungstätigkeit

2006 Promotionsstipendium der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Forschungsfreisemester
09/2007 Teilnahme am „10th International Blood-Brain Barrier Symposium“ in Potsdam mit dem Beitrag „Oxidative stress up-regulates NMDA receptor expression in brain endothelial cells“
2008 Förderung durch das Graduiertenkolleg „Neurowissenschaften“ der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
08/2009 Publikation in „Free Radical Biology and Medicine“:
“Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium“ (Betzen et al. 2009)

Engagement in der Lehre

seit 2006 Initiierung und Durchführung eines Tutoriums in der Physiologie
2006-2008 Tätigkeiten als Praktikumsbetreuer in der Physiologie
2007-2009 Tutor im Institut für Mikrobiologie und Virologie